

**Aus dem Institut für Toxikologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Gerhard Fritz**

Mukositis enoralis

Lovastatin als Modulator der Doxorubicin- und
strahlungsinduzierten Stressantwort humaner Keratinozyten

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anne Albers

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. N. Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. rer. nat. G. Fritz

Zweitgutachter: PD Dr. med. B. Hartung

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden wie folgt veröffentlicht

Ziegler, V., Albers, A., Fritz, G., „*Lovastatin protects keratinocytes from DNA damage-related pro-apoptotic stress responses stimulated by anticancer therapeutics.*” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1863, no. 6 Pt A, pp. 1082–1092, Jun. 2016.

Zusammenfassung

Die orale Mukositis, die Schleimhauterytheme und -ulzerationen bedingt, stellt eine häufig therapielimitierende Nebenwirkung einer Chemotherapie mit Doxorubicin, sowie der Bestrahlung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich dar. In dieser Arbeit wird der zyto- und genoprotektive Effekt des HMG-CoA-Reduktasehemmers Lovastatin gegenüber der Doxorubicin- und strahlungsinduzierten Stressantwort humaner Keratinozyten, sowie die Funktion von Rac1 für die Lovastatineffekte untersucht. Zu diesem Zweck erfolgte nach einem standardisierten Behandlungsschema die Untersuchung von Viabilität, Zellzyklusverteilung, DNA-Doppelstrangbrüchen, Proliferation und der DNA-Schadenantwort. Um die Funktion von Rac1 genauer zu charakterisieren, wurden analog Experimente mit dem spezifischen Rac1-Inhibitor EHT 1864 durchgeführt.

Eine transiente Vorbehandlung mit 30 μ M Lovastatin reduzierte die Viabilitätsabnahme der HaCaT-Keratinozyten nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung und Doxorubicin signifikant. Dieser Effekt wurde durch einen geringeren Zellzyklusblock in der G₂-Phase und einen kleineren Zellanteil in der SubG1-Fraktion widerspiegelt. Gleichzeitig ließen die Ergebnisse der immunzytochemischen Färbung von ko-lokalisierten 53BP1- und γ H2AX-Foci auf eine verbesserte Schadenantwort schließen, auf die auch die Ergebnisse der PCR-Analyse hindeuteten. Durch die Untersuchung der EdU-Inkorporation konnte eine durch Lovastatin bedingte Proliferationshemmung als Begründung für die protektiven Effekte ausgeschlossen werden. Bei der Vorbehandlung mit dem spezifischen Rac1-Inhibitor EHT 1864 war es nicht möglich, die zytoprotektiven Effekte, die Lovastatin gegenüber der Behandlung mit ionisierender Strahlung oder Doxorubicin hatte, zu reproduzieren.

Insgesamt zeigte sich im Rahmen der Experimente, dass Lovastatin protektiv auf die HaCaT-Keratinozyten gegenüber den zytotoxischen Effekten von ionisierender Strahlung und Doxorubicin wirkte. Diese Effekte beruhten nicht auf einer Proliferationshemmung, sondern auf einer verbesserten DNA-Schadenantwort, die sich auch in einer gesteigerten Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen zeigte. Rac1 konnte im Rahmen der Untersuchungen nicht als Zielprotein der Lovastatineffekte verifiziert werden.

Auf Grundlage der Untersuchungsergebnisse ist die radioprotektive Wirkung von Lovastatin besonders hervorzuheben. In weiterer Folge empfiehlt sich die Durchführung eines geeigneten präklinischen *in vivo* Modells mit anschließenden klinischen Studien.

Summary

Oral mucositis is a frequent side effect and limiting factor in chemotherapies with Doxorubicin and radiotherapy of cranio-cervical tumors. It is characterized by an inflammation of the oral mucosa and leads to erythema and ulcerative lesions.

We investigated the cyto- and genoprotective effects of the HMG-CoA reductase inhibitor Lovastatin on Doxorubicin- and radiation-related stress responses of human keratinocytes, as well as the role of Rac1 in these Lovastatin-mediated effects.

Therefore, we examined the viability and distribution of cell cycle, as well as DNA-double-strand-breaks, proliferation and DNA-damage-response in a standardized *in vitro* protocol using human keratinocytes (HaCaT). According experiments were conducted with the specific Rac1-inhibitor EHT 1864 in order to investigate the function of Rac1 on Lovastatin-induced effects.

We found that the decrease of viability after treatment with ionizing radiation and Doxorubicin was significantly reduced when the HaCaT keratinocytes were pretreated with 30 μ M Lovastatin. The cytoprotective effect of Lovastatin was additionally substantiated by a decreased G₂ cell cycle arrest and reduced number of cells in the SubG1-fraction after irradiation or Doxorubicin treatment. At the same time, immunocytochemical staining of co-localised 53BP1- and γ H2AX-foci depicted enhanced DNA damage response (DDR), also affirmed by the results of PCR-analysis. Inhibition of proliferation by Lovastatin administration as explanation for the protective effects could be excluded by examination of the EdU-incorporation. When pretreated with the specific Rac1 inhibitor EHT 1864, the cytoprotective effects of treatment with ionizing radiation or Doxorubicin were obstructed.

In conclusion, the experiments revealed that Lovastatin has a protective effect on HaCaT keratinocytes against the cytotoxic effects of ionizing radiation and Doxorubicin. These effects were shown not to be based on the inhibition of proliferation, but rather enhanced DNA damage response, in turn based on an increased repair rate of DNA double strand breaks.

Rac1 was not characterized as a target protein for the Lovastatin-effects in this experimental series. The radioprotective effect of Lovastatin has to be emphasised. The development of a suitable pre-clinical *in vivo* model with subsequent clinical studies is recommended.

Abkürzungsverzeichnis

53BP1	p53-binding protein 1
AB	Alamar Blue (Resazurin-Reduktionstest)
ACTB	Actin beta
AP1	Activator protein 1
Atg7	Autophagy related 7
ATM	Ataxia and teleangiectasia mutated
ATR	Ataxia, teleangiectasia and Rad3 related
AUT	Austria
BAL	Broncheoalveoläre Lavage
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BrdU	5-bromo-2-deoxyuridine
BSA	Bovine serum albumin
CAN	Canada
Ccna1	Cyclin A1
Ccne1	Cyclin E1
Cdkn1	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
Chek1	Checkpoint kinase 1
Chek2	Checkpoint kinase 2
Cxcr4	Chemokine receptor 4
Cyp1a1	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1
DAPI	4-6-diamidino-2-phenylindole
DDR	DNA damage response
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyribonuclease
dNTP	Deoxynucleotidtriphosphate
Doxo	Doxorubicin
DTT	Dithiothreitol

Abkürzungsverzeichnis

EdU	5-ethynyl-2-deoxyuridine
FCS	Fetal calf serum
Fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
g	g-Kraft
Gadd45 α	Growth arrest and DNA-damage-inducible alpha
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GBR	Great Britain
GDP	Guanosine-5-diphosphate
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GER	Germany
GTP	Guanosine-5-triphosphate
Gy	Gray
H2AX	Histone H2A
γ H2AX	Ser139 phosphoryliertes H2AX
HaCaT-Keratinozyt	Human adult low calcium high temperature keratinocyte
HepG2	Human liver carcinoma cell line
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HR	Homologous recombination
HUVEC	Human umbilical vein cells
IC ₅₀	Half maximal inhibitory concentration
Il-6	Interleukin-6
IR	Ionizing radiation
JNK	C-jun N-terminal kinase
JPN	Japan
K	Kelvin
KOF	Körperoberfläche
LD ₅₀	Median lethal dose
LDL	Low density lipoprotein
Lova	Lovastatin

Abkürzungsverzeichnis

Min	Minute
Mmp3	Matrix metalloproteinase 3
MTT	3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide
NFκB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NHBE	Human bronchial epithelial cells
NHEJ	Non-homologous end joining
Nos3	Nitric oxide synthase 3
Oligo-dT	Oligo-Deoxythymidine
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline with Triton X-100
PCR	Polymerase chain reaction
Poε	Polymerase epsilon
PTA	Polymyxin, Tobramycin, Amphotericin B
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
Ras	Rat sarcoma
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
Rho	Ras homologue
ROCK	Rho-associated protein kinase
ROS	Reactive oxygen species
SAPK	Stress-activated protein kinase
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
SUI	Switzerland
Timp2	Tissue inhibitor of metalloproteinase 2
TNFα	Tumor necrosis factor alpha
TPE	Taiwan
Trp63	Transformation related protein 63
US	United States
USA	United States of America
VSMC	Vascular smooth muscle cells

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Orale Mukositis.....	1
1.2	Doxorubicin als Tumorthapeutikum.....	3
1.3	Ionisierende Strahlung in der Tumorthherapie.....	5
1.4	Statine in der Pharmakotherapie.....	7
1.5	Statine beeinflussen die Wirkung der Therapie mit Doxorubicin oder ionisierender Strahlung.....	9
1.6	Statine beeinflussen die Funktion und Wirkung der Rho-GTPasen.....	10
1.7	Zielsetzung.....	14
2	Material.....	15
2.1	Zelllinien und Medien.....	15
2.2	Zellkulturmaterial.....	15
2.3	Chemikalien.....	16
2.4	Lösungen.....	17
2.5	Antikörper.....	18
2.6	Geräte.....	18
2.7	Computersoftware.....	20
3	Methoden.....	21
3.1	Zellkultivierung.....	21
3.2	Kryokonservierung von Zellen.....	21
3.3	Bestimmung der Zellviabilität.....	22
3.3.1	Resazurin-Reduktionstest.....	22
3.3.2	MTT-Test.....	23
3.4	Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklusverteilung.....	24
3.5	Immunzytochemie: Ko-Lokalisation von γ H2AX und 53BP1 Foci.....	25
3.6	Bestimmung der Zellproliferation: EdU-Inkorporation.....	26
3.7	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion.....	27

Inhaltsverzeichnis

3.7.1	RNA-Isolation aus Zellen	27
3.7.2	cDNA-Synthese	28
3.7.3	Polymerase-Kettenreaktion.....	28
4	Ergebnisse	30
4.1	Die Messergebnisse von Resazurin-Reduktionstest und MTT-Test sind äquivalent bei den HaCaT-Keratinocyten	30
4.1.1	Bestimmung des zytotoxischen Potentials der Agenzien und Modulatoren..	31
4.1.2	Lovastatin reduziert die strahlungsinduzierte Viabilitätsabnahme signifikant	36
4.1.3	Lovastatin reduziert die Doxorubicin-induzierte Viabilitätsabnahme signifikant	39
4.2	Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus und der SubG1-Fraktion	43
4.2.1	Lovastatin reduziert die strahlungsbedingte Induktion der SubG1-Fraktion signifikant	45
4.2.2	Lovastatin reduziert den strahlungs-induzierten Zellzyklusblock in der G ₂ -Phase	47
4.2.3	Lovastatin reduziert die Doxorubicin-bedingte Induktion der SubG1-Fraktion	50
4.2.4	Lovastatin reduziert den Doxorubicin-induzierten Zellzyklusblock	51
4.3	Ko-lokalisierte γ H2AX- und 53BP1-Foci als Surrogatmarker für DNA-Doppelstrangbrüche	54
4.3.1	Lovastatin reduziert die Anzahl strahlungsinduzierter Foci signifikant	55
4.3.2	Lovastatin reduziert die Anzahl Doxorubicin-induzierter Foci signifikant...	57
4.4	Die zytoprotektiven Effekte von Lovastatin beruhen nicht auf einer Proliferationshemmung.....	59
4.5	Analyse der genoprotektiven Mechanismen von Lovastatin gegenüber ionisierender Strahlung	62
4.5.1	Lovastatin und ionisierende Strahlung induzieren eine Stressantwort auf molekularer Ebene	63
4.5.2	Lovastatin moduliert die strahlungsinduzierte DNA-Schadenantwort.....	65

Inhaltsverzeichnis

4.6	Rac1 als mögliches Zielprotein der protektiven Lovastatinwirkung	66
4.6.1	EHT 1864 reduziert nicht die strahlungs- und Doxorubicin-induzierte Viabilitätsreduktion	66
4.6.2	EHT 1864 hat keinen relevanten Einfluss auf die strahlungsinduzierten Veränderungen der SubG1-Fraktion und des Zellzyklus	69
4.6.3	EHT 1864 hat keinen relevanten Einfluss auf die Doxorubicin-induzierten Veränderungen der SubG1-Fraktion und des Zellzyklus	71
5	Diskussion.....	74
5.1	Lovastatin wirkt protektiv gegenüber der zytotoxischen Wirkung ionisierender Strahlung.....	75
5.2	Lovastatin wirkt protektiv gegenüber der zytotoxischen Doxorubicinwirkung ...	77
5.3	Die zytoprotektiven Effekte von Lovastatin beruhen nicht auf einer Proliferationshemmung.....	80
5.4	Lovastatin beeinflusst die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen	81
5.5	Rac1 als ein möglicher Zielpunkt der zytoprotektiven Wirkung von Lovastatin .	83
5.6	Lovastatin wirkt protektiv gegenüber ionisierender Strahlung durch die Beeinflussung zentraler Signalkaskaden	85
5.7	Lovastatin ist ein geeigneter Radioprotektor	89
6	Literaturverzeichnis	92
7	Anhang.....	104
7.1	Primerliste	104
7.2	Regulation der Genexpression durch Lovastatin und ionisierende Strahlung	108
8	Danksagung	

1 Einleitung

1.1 Orale Mukositis

Krebserkrankungen belegen in der Todesursachenstatistik der BRD hinter den Herz-Kreislaufkrankungen den zweiten Platz und führen aufgrund der notwendigen intensiven Therapie- und Pflegemaßnahmen zu erheblichen Kosten im Gesundheitssystem [1]. Der Tod ist häufig weniger durch den Tumor oder die Krebserkrankung selbst, als durch eine sekundäre Infektion oder die Kachexie des Erkrankten bedingt [2].

Der deutlich reduzierte Allgemein- und Ernährungszustand ist in vielen Fällen Folge einer intensivierten Tumorthherapie, da diese nicht nur auf das Tumor-, sondern auch auf das Normalgewebe zytotoxisch wirkt. Eine häufige Nebenwirkung der Chemotherapie mit Anthrazyklinen (z.B. Doxorubicin), Antimetaboliten (z.B. 5-Fluorouracil), Vinca-Alkaloiden (z.B. Vincristin) und Podophyllin-Derivaten (z.B. Etoposid), sowie von Bestrahlungen in der Kopf-Hals-Region ist die orale Mukositis, auch als Stomatitis bezeichnet [3, 4].

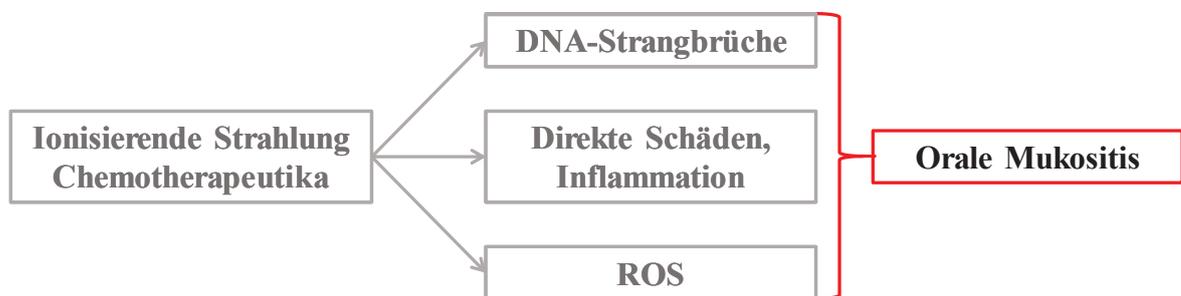


Abb. 1 Schematische Darstellung der Entstehung der oralen Mukositis durch ionisierende Strahlung und Chemotherapeutika wie z.B. Doxorubicin.

Für die Entstehung der oralen Mukositis werden unter anderem die folgenden Prozesse verantwortlich gemacht (Abbildung, Abb. 1): a) Direkte Schäden der Epithelzellen, die zu einer Rekrutierung inflammatorischer Zellen führen können, b) Induktion von DNA-Strangbrüchen, die die DNA-Schadenantwort sowie apoptotische Signalwege initiieren können und c) Generierung reaktiver Sauerstoffspezies, die zu vermehrten DNA-Schäden sowie zur Beeinträchtigung weiterer zellulärer Komponenten führen können. Diese drei Schädigungsmechanismen betreffen insbesondere die basalen Epithelzellen (Keratinocyten). [5, 6]

Einleitung

Gradiert wird die orale Mukositis anhand eines Systems, das die Grade 0 bis III beinhaltet: Grad 0 beschreibt eine intakte Mukosa, während bei Grad I bereits ein Erythem zu erkennen ist oder der Patient leichte Schmerzen verspürt. Grad II umfasst bereits ein Erythem mit Ulzerationen und in der Konsequenz starke Schmerzen, während die orale Nahrungsaufnahme noch möglich ist. Bei der schwersten Ausprägung, dem Grad III, leidet der Patient unter stärksten, auch durch Opiate nur schwer kontrollierbaren Schmerzen, die das Essen und häufig auch das Trinken nicht mehr zulassen. [7]

Aufgrund der starken Schmerzen und der damit zusammenhängenden Malnutrition ist die orale Mukositis eine der negativen Therapiefolgen, die den höchsten Leidensdruck bei den Betroffenen erzeugt. Neben der Epidermis ist auch die Mukosa eine wichtige Barriere gegenüber dem äußeren Milieu. Als Folge einer Barriestörung durch die lokale Entzündungsreaktion bei der Stomatitis kann es zu Infektionen kommen, die potentielle Auslöser einer Sepsis sein können. Hier sollte bedacht werden, dass jede Infektion eines immunsupprimierten Patienten potentiell dessen Tod bedingen kann. [3] Dies führt unter anderem bei knochenmarktransplantierten Patienten zu einem signifikant schlechteren klinischen Therapieergebnis bei gleichzeitig gesteigerten Therapiekosten [4].

Bisher ist die Behandlung der oralen Mukositis kaum möglich, obgleich verschiedene Therapieansätze erprobt wurden. Dabei ist Palifermin, ein rekombinanter Keratinozytenwachstumsfaktor, das erste Medikament, für welches eine bedingt protektive Wirkung auf die Mundschleimhaut gegenüber einigen Strahlen- und Chemotherapien nachgewiesen wurde [8]. Zu den biologischen Effekten von Palifermin zählen neben der trophischen Wirkung auf die Mundschleimhaut, eine Hochregulation der Glutathionperoxidase (Reduktion von Peroxiden), eine verbesserte Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (Aktivierung von DNA-Polymerasen), sowie eine Inhibition von Apoptosesignalwegen [9-12]. Daneben werden weitere Substanzen und Behandlungskonzepte mit unterschiedlichem, zumeist geringem Erfolg eingesetzt: Allopurinol, Aloe Vera, Amifostin, Kryotherapie, Glutamin, medizinischer Honig, Laserbehandlung, PTA-Kombinationstherapie [13]. Für eine optimale Tumorthherapie muss es das Ziel sein, die unerwünschten Wirkungen der Krebstherapie auf das Normalgewebe weitestgehend zu reduzieren bei gleichzeitig erhaltener optimaler Antitumorwirksamkeit.

1.2 Doxorubicin als Tumorthapeutikum

Die klassische Tumorthherapie beruht grundsätzlich auf den drei Säulen: Chirurgie, Strahlen- und Zytostatikatherapie. In den letzten Jahren haben als weitere wichtige Therapieansätze die Gabe rekombinanter Antikörper und die Hormontherapie an Bedeutung gewonnen [14, 15]. Zu den wesentlichen Vertretern der Zytostatika zählen Alkylanzien (z.B. Cyclophosphamid), Platinanaloga, Anthrazykline (z.B. Doxorubicin), Bleomycin als Vertreter der Antibiotika, Mitosehemmer und Antimetabolite [16-19]. Dabei ist die Wirkungsweise different, der Wirkort jedoch in jedem Fall in Geweben mit einer hohen Zellproliferationsrate festgelegt [20].

Doxorubicin, ein Hydroxymethylanalogon von Daunorubicin, ist ein Vertreter der Anthrazyklinderivate. Als Naturstoff kann es direkt aus dem Bakterium *Streptomyces peucetius var. caesius* isoliert werden. [21] Es findet Anwendung als Tumorthapeutikum gegen eine Vielzahl von Entitäten, wie Lymphome, akute Leukämien, Neuroblastom, sowie als Bestandteil der Therapiepläne beim Mamma- und Bronchialkarzinom [22].

Der zytotoxische Effekt, der die hohe Wirksamkeit als Tumorthapeutikum, aber auch die dosislimitierende, irreversible Kardiotoxizität und die orale Mukositis bedingt, beruht auf der Induktion oxidativen Stresses, und der Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch die Interkalation in den DNA-Doppelstrang sowie der Hemmung der Topoisomerase II [23-25]. Die Topoisomerase II ist von eminenter Bedeutung für die DNA-Replikation und -Transkription, da sie die Entwindung einer *supercoiled* DNA-Helix katalysiert [26]. Bei diesem Prozess bildet die Topoisomerase einen Komplex mit der DNA, den *cleavable complex*, und durchtrennt beide DNA-Einzelstränge, um ein Entwinden möglich zu machen [27]. An den Komplex bindet Doxorubicin und verhindert die Reparatur des DNA-Doppelstrangbruchs, der bereits durch die Topoisomerase II induziert wurde [25]. Dieser Mechanismus scheint insbesondere bei geringen Doxorubicinkonzentrationen unter 1 μM von Bedeutung zu sein, während es bei höheren Konzentrationen zunehmend zu einer Interkalation in den DNA-Doppelstrang kommt [28]. Bei der Interkalation entstehen insbesondere *interstrand crosslinks*, bei denen es sich um eine Verbindung zwischen den Einzelsträngen des DNA-Doppelstrangs handelt [24]. Neben diesen beiden Hauptmechanismen, die den zytotoxischen Effekt bedingen, kommt es durch *Redoxcycling* zur Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Als weiteren zytotoxischen Mechanismus bewirkt Doxorubicin eine Schädigung der

Einleitung

Mitochondrien und die Akkumulation von Eisen in ebendiesen, wodurch es zum Funktionsverlust und wiederum zur vermehrten ROS-Freisetzung kommt [29, 30]. Die reaktiven Sauerstoffspezies werden als wichtige Auslöser für die irreversible Kardiotoxizität diskutiert. [31] Bei der akuten und chronischen irreversiblen Kardiotoxizität handelt es sich um die entscheidende, da dosislimitierende Nebenwirkung von Doxorubicin [32].

Als besondere Risikofaktoren für das Auftreten irreversibler dilatativer Kardiomyopathien sind ein Patientenalter über 65 Jahren und ein Überschreiten der kumulativen Grenzdosis, die im Allgemeinen mit $550 \text{ mg/m}^2 \text{ KOF}$ angegeben wird, zu nennen [33]. Klinisch erprobte Möglichkeiten zur Reduktion dieses schweren Krankheitsbildes sind die kontinuierliche Doxorubicininfusion über einen längeren Zeitraum und die Verwendung von liposomalem Doxorubicin [34, 35]. Neben diesen Veränderungen des Therapieschemas und der Formulierung ist es von eminenter Bedeutung, die kumulative Grenzdosis nicht zu überschreiten [33]. Unter Berücksichtigung der Wirkung von Doxorubicin auf die Mitochondrien und insbesondere der Akkumulation von Eisen in diesen (mit folgendem Funktionsverlust) konnten kardioprotektive Effekte mittels Dexrazoxan, das Eisenkomplexe bildet, erzielt werden [30].

Während man für die Reduktion der Kardiotoxizität inzwischen erste Therapieansätze hat, stellt die orale Mukositis ein bisher nicht gelöstes Problem dar. Sie gehört ebenso wie die Kardiotoxizität und die Myelosuppression zu den potentiell lebensbedrohlichen Nebenwirkungen. Als typische unerwünschte Wirkung kommt es darüber hinaus regelhaft zum Auftreten einer Alopezie. [36] Betroffen von Erythem und Ulzeration der oralen Mukosa sind zwischen 40 % und 70 % der Patienten, die in der Folge supportive Therapien erhalten müssen [36, 37]. Unglücklicherweise hat sich gezeigt, dass Maßnahmen, die die Kardiotoxizität von Anthrazyklinen herabsetzen, eine verstärkte Mukositis bedingen können. Dies betrifft zum einen die Anwendung von pegyliertem liposomalen Doxorubicin [38]. Zum anderen beeinflusst ein Wechsel vom Standardprotokoll, das eine Zyklusdauer von drei Wochen vorsieht, zur einmal wöchentlichen Applikation das Auftreten der oralen Mukositis ungünstig, wobei hier die Ursache noch nicht geklärt werden konnte [39].

1.3 Ionisierende Strahlung in der Tumorthherapie

Die Anwendung von ionisierender Strahlung kann sowohl der Diagnostik, als auch der Therapie dienen. Die bedeutendste therapeutische Funktion kommt ihr im Rahmen der kurativen und palliativen Tumorthherapie zu. Die Wirkung erfolgt dabei ebenso wie die unerwünschten Wirkungen lokal, was ein wichtiger Unterschied gegenüber der systemischen Therapie mit Chemotherapeutika wie Doxorubicin ist. Als Alternative zur chirurgischen Resektion besteht z.B. bei Kopf-Hals-Tumoren die Option zur alleinigen oder kombinierten Radiotherapie [40]. Therapielimitierend sind die akuten Nebenwirkungen wie Mukositis, Xerostomie und Erytheme der Haut. Darüber hinaus kommt es zu späten Nebenwirkungen wie einer Gewebeatrophie, chronischen Ulzerationen und der Ausbildung von Teleangiektasien und Osteonekrosen. In der Summe bedingen die chronischen Nebenwirkungen ebenso wie die akuten Therapiefolgen einen erheblichen Leidensdruck des Patienten. [41]

Die Antitumorwirksamkeit einer Therapie mit ionisierender Strahlung steht in einem proportionalen Zusammenhang mit der applizierten Strahlendosis auf ein Gewebe. Da das Normalgewebe ebenso wie das Tumorgewebe geschädigt wird, erfolgt die Bestrahlung in der Regel fraktioniert. Hierbei wird die Gesamtstrahlendosis in kleinere Einzeldosen aufgeteilt und im Rahmen zahlreicher Bestrahlungstermine appliziert. Aufgrund dessen, dass das Normalgewebe eine höhere Regenerationsfähigkeit als das Tumorgewebe aufweist, kommt es zu einer geringeren Schädigung wichtiger Strukturen, die insbesondere im Kopf-Hals-Bereich dicht am Bestrahlungsfeld liegen. Die Wirksamkeit der Strahlentherapie im Tumorgebiet wird durch die Fraktionierung hingegen nicht negativ beeinflusst. [42]

Eine weitere Möglichkeit das Normalgewebe zu schonen, besteht in der Anwendung der intensitätsmodulierten Radiotherapie. Hierbei wird nicht nur das ausgewählte Bestrahlungsfeld möglichst klein gehalten, sondern es werden auch innerhalb des Bestrahlungsfeldes unterschiedliche Strahlendosen appliziert. In den zentralen Tumorstrukturen des HNSCC betragen diese bis zu 80 Gy. [43]

Die zytotoxische Wirkung der ionisierenden Strahlung ist durch verschiedene molekulare Mechanismen bedingt: Zum einen kommt es durch die Strahlung direkt zur Entstehung von DNA-Einzel- und DNA-Doppelstrangbrüchen [44]. Zum anderen werden durch die Oxidation des Wassers oder Reaktionen bestehender ROS hochtoxische Hydroxylradikale gebildet. Die Hydroxylradikale bewirken neben DNA-Doppelstrangbrüchen den Verlust

Einleitung

und die Modifikation von Basen in der DNA. Somit ist das Ausmaß des induzierten DNA-Schadens nicht nur abhängig von den DNA-Reparaturmechanismen, sondern auch von der antioxidativen Kapazität der Zelle. [45, 46] Als weitere Ursache für den Zelltod - unabhängig von den induzierten DNA-Schäden - wird eine direkte, TNF α -vermittelte Apoptoseinduktion durch die Interaktion der ionisierenden Strahlung mit Sphingomyelin in der Zellmembran beschrieben [47]. Auf der Proteinebene kommt es durch reaktive Sauerstoffspezies, zu einer Degradation. Hierdurch bedingt kann es zum Verlust der Zellintegrität kommen. [48]

Aufgrund der beschriebenen schweren, häufig dosislimitierenden Nebenwirkungen steht die Suche nach einem geeigneten Radioprotektor im Fokus. Ein Radioprotektor ist eine Substanz, die vor oder während der Bestrahlung verabreicht wird, um die Schäden am Normalgewebe zu reduzieren. Das Ziel besteht in einer Therapieoptimierung durch höhere kumulative Strahlendosen bei einer gleichzeitigen Reduktion der Nebenwirkungen [49].

Die bis heute vielversprechendste Substanz ist Amifostin, eine phosphorylierte und damit inaktive Vorstufe eines Aminothiolalkohols, welche durch die endotheliale alkalische Phosphatase aktiviert wird. Die Spezifität für eine Protektion des Normalgewebes ist durch die unterschiedliche Expression der alkalischen Phosphatase im Tumor- und im Normalgewebe bedingt. Der Schutzmechanismus ist multifaktoriell. Von Bedeutung sind das Abfangen freier Radikale, eine verbesserte DNA-Reparatur, sowie die Induktion der zellulären Hypoxie. [50] Neben der kurzen Plasmahalbwertszeit, die eine Gabe unmittelbar vor der Bestrahlung verlangt, sind die Nebenwirkungen ein weiteres Anwendungsproblem von Amifostin [51]. Aufgrund von hypotensiven Entgleisungen, Erbrechen oder allergischer Reaktionen mussten in einer von Rades *et al.* durchgeführten klinischen Studie 41 % der HNSCC-Patienten die Amifostinanwendung abbrechen [52].

Eine weitere Substanz mit positiven Effekten bei der Anwendung durch Bestrahlungspatienten ist der Keratinozytenwachstumsfaktor Palifermin. Dieser wirkt anders als Amifostin weniger durch protektive Eigenschaften als durch die Beschleunigung der Regeneration zerstörter Mukosa. Er steigert die Proliferation der Epithelzellen bei gleichzeitiger Reduktion der Apoptoserate. [53] Allerdings stellen auch hier die Nebenwirkungen, insbesondere Hautausschlag und Geschmacksstörungen, eine Dosislimitation dar [49]. Zusammenfassend ist zu dem Schluss zu kommen, dass ein potenter, nebenwirkungsarmer und kostengünstiger Radioprotektor derzeit für die regelhafte klinische Anwendung nicht verfügbar ist.

1.4 Statine in der Pharmakotherapie

Lovastatin ist der Gruppe der HMG-CoA-Reduktaseinhibitoren, auch Statine genannt, zuzuordnen. Die HMG-CoA-Reduktase wirkt als Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese [54]. Von den lipophilen Statinen, zu denen neben Lova-, auch Atovar-, Ceriva-, Fluva-, Pitava- und Simvastatin gehören, sind die Hydrophilen (Prava- und Rosuvastatin) abzugrenzen. Von Bedeutung ist diese Stoffeigenschaft für die hepatische Metabolisierung, die nur im Fall der lipophilen Statine Cytochrom P450-abhängig geschieht. Die einzige Ausnahme bildet hier Pitavastatin, welches ebenso wie die Hydrophilen nicht hepatisch metabolisiert wird. [55] Neben der Unterscheidung hinsichtlich chemisch-metabolischer Eigenschaften kann die Gruppe der Statine auch bezüglich der Synthese untergliedert werden: Während Lovastatin direkt aus dem Schimmelpilz *Aspergillus terreus* isoliert werden kann, sind alle anderen mit Ausnahme von Prava- und Simvastatin vollständig synthetischen Ursprungs [56, 57]. Pravastatin ist ein Naturstoff, der unter anderem durch das Bakterium *Actinomadura sp.* synthetisiert wird, während es sich bei Simvastatin um ein semisynthetisches Derivat von Lovastatin handelt [58, 59].

Statine kommen in der Pharmakotherapie der Hypercholesterinämie seit dem Ende der 1980er Jahre zum Einsatz [60]. Die Wirkung beruht auf einer Hemmung der Cholesterinbiosynthese mittels der Inhibition des Schlüsselenzyms HMG-CoA-Reduktase [54]. Dabei wird vor allem der Anteil des LDL-Cholesterins am Gesamtcholesterin reduziert. Insbesondere das LDL-Cholesterin ist als wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktor einzuordnen. [61, 62] Lovastatin gehörte bereits wenige Jahre nach der Markteinführung 1987 zu den absatzstärksten Medikamenten in den USA [60]. Die Anwendung erfolgt als Medikament der ersten Wahl bei der Primärprävention kardiovaskulärer Ereignisse [63]. Mit Blick auf die Todesursachenstatistik der BRD, die seit Jahren durch kardiovaskuläre Erkrankungen angeführt wird, ist hiermit auch die hohe Verordnungszahl leicht verständlich [64].

Neben diesem Anwendungsbereich verfügen Statine über vielfältige positive Wirkeigenschaften im Bereich der Transplantationsmedizin, der Demenzerkrankungen und der Tumorthherapie: Im Rahmen einer klinischen Studie wurde gezeigt, dass der Anteil der Patienten, die eine Lungentransplantation länger als 6 Jahre überleben in der Statintherapierten Kohorte etwa doppelt so hoch war wie in der Kontrollgruppe. Gleichzeitig

Einleitung

waren in der bronchoalveolären Lavage der Kontrollgruppe deutlich mehr Entzündungszellen vorzufinden, sodass eine Reduktion der Immunantwort durch die Statintherapie anzunehmen ist [65]. Bei Diabetes Typ 2-Patienten, die eine Statintherapie erhalten, wurde eine deutlich geringere Reduktion der kognitiven Fähigkeiten als in der Kontrollgruppe ohne Statintherapie im selben Zeitraum beobachtet [66]. Simvastatin sensitivierte nicht nur Imatinib-resistente Leukämiezellen gegenüber Imatinib in einem *in vitro* Modell, sondern reduzierte auch singular angewendet in einem *in vivo* Mausmodell die Progression des malignen Melanoms [67, 68]. Eine restriktive Anwendung von Statinen wird lediglich in der Palliativmedizin und der Geriatrie empfohlen. Für diese Patientenkollektive wurde bisher kein positiver Effekt nachgewiesen, der die Risiken der Multimedikation und Einschränkung der Lebensqualität durch die Einnahme in Summe zahlreicher Tabletten überwog [69].

Insgesamt zeichnen sich Statine durch eine hohe Anwendungssicherheit und geringe Nebenwirkungen aus [70]. Beschriebene Nebenwirkungen sind asymptomatische Transaminasenerhöhungen, Ausbildung einer Polyneuropathie bei der Anwendung über sehr lange Zeiträume, sowie Myopathien [60, 71, 72]. Als schwerste Form der Myopathie kann eine Rhabdomyolyse durch Statine bedingt werden. Dabei handelt es sich um die Zerstörung der Skelettmuskelfasern mit dem Übertritt von Muskelbestandteilen in das Blut, die ein akutes Nierenversagen auslösen können [73]. Ursächlich scheint die Inhibition der HMG-CoA-Reduktase und damit der Cholesterinbiosynthese in Skelettmuskelzellen zu sein, wie eine *in vivo* Studie mit skelettmuskelspezifischen HMG-CoA-Reduktase *knock-out* Mäusen gezeigt hat [74]. Auch Todesfälle bedingt durch eine Statin-induzierte Rhabdomyolyse wurden beschrieben, sodass es Anfang der 2000er zur Marktrücknahme von Cerivastatin kam [75]. Anzumerken ist jedoch, dass die Fälle im Rahmen einer Ko-Medikation mit Fibraten auftraten [76]. Bei der Anwendung von Lovastatin ist das Risiko einer Rhabdomyolyse grundsätzlich deutlich geringer [77]. Gleichzeitig ist es unerlässlich, die Wechselwirkungen zu beachten: So ist unter anderem eine Ko-Medikation mit Fibraten obsolet [78]. Darüber hinaus ist die Substitution von Selen als Prophylaxe in der Diskussion, da die Glutathionperoxidase, ein Enzym aus der Gruppe der Selenoproteine, eine wichtige Funktion bei der Abwehr von oxidativem Stress in Myozyten hat [79]. Den Verdacht, dass eine Statintherapie das Brustkrebsrisiko signifikant erhöht, konnten zuletzt Borgquist *et al.* im Rahmen ihrer *Nurses' Health Study* widerlegen [80].

Zusammenfassend sind Statine als sichere Pharmaka mit verhältnismäßig großer therapeutischer Breite und langer Anwendungserfahrung zu charakterisieren, wenngleich es von eminenter Bedeutung ist, die Arzneimittelinteraktion mit Fibraten und dem resultierenden gesteigerten Rhabdomyolyserisiko zu beachten.

1.5 Statine beeinflussen die Wirkung der Therapie mit Doxorubicin oder ionisierender Strahlung

Die Wirkstoffgruppe der Statine zeichnet sich durch eine lange Anwendungserfahrung als Erstlinienmedikation zur Blutfettsenkung und dem sicher kontrollierbaren Spektrum unerwünschter Wirkungen aus. Im Rahmen einer groß angelegten Meta-Analyse zeigten Dale *et al.*, dass Statine selbst das Krebsrisiko nicht erhöhen [81]. Mittels einer retrospektiven Analyse der Krebserkrankungen in Dänemark stellten Nielsen *et al.* fest, dass Statine die tumorbedingte Mortalität reduzieren [82]. Gleichzeitig konnte in experimentellen Studien eine Sensibilisierung von Tumorzellen gegenüber Doxorubicin und ionisierender Strahlung durch Lovastatin nachgewiesen werden: In einem *in vitro* Modell sensibilisierte Lovastatin humane Neuroblastomzellen, die häufig Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika ausbilden, für Doxorubicin [83]. Auch die Wirkung ionisierender Strahlung auf maligne Zellen wird durch Lovastatin potenziert. Im Rahmen von *in vitro*-Studien wurde eine Sensibilisierung von Adenokarzinomzellen der Lunge und von Lymphomzellen durch Lovastatin gegenüber ionisierender Strahlung beobachtet [84]. Insgesamt sind Statine auch unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse als optimale Adjuvantien in der Tumorthherapie zu charakterisieren.

In zahlreichen Studien konnte bereits ein protektiver Effekt auf das Normalgewebe durch Statine gegenüber Doxorubicin und ionisierender Strahlung gezeigt werden: Die Präinkubation mit Lovastatin vor der Applikation von Doxorubicin hat sowohl in humanen Endothelzellen, als auch in Kardiomyoblasten von Ratten die DNA-Schadensantwort herunterreguliert: Bei den Endothelzellen kam es zu einer reduzierten p53-Expression, einer geringeren Aktivierung von Chk-1 und SAPK/JNK, sowie zu einer reduzierten Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen [85]. Bei den Kardiomyoblasten hingegen konnte keine Beeinflussung der Chk-1-Phosphorylierung und damit des Zellzyklus beobachtet werden, während die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Doxorubicin ebenso wie in den humanen Endothelzellen reduziert wurde [86]. Neben diesen *in vitro* Befunden wurde bereits eine Reduktion der Doxorubicin-induzierten Hepato- und Kardiotoxizität in *in vivo* Modellen erzielt. Ursächlich erscheint auch hier

eine Protektion vor Doxorubicin-induzierten DNA-Schäden [87, 88]. Feleszko *et al.* haben darüber hinaus gezeigt, dass eine äquivalente Lovastatinkonzentration im *in vivo* Mausmodell und im *in vitro* Modell mit drei Tumorzelllinien die Antitumoraktivität von Doxorubicin potenziert bei gleichzeitig reduzierter Kardiotoxizität [89]. Aufgrund dieser Ergebnisse ist die Hypothese aufzustellen, dass Lovastatin ebenso protektiv gegenüber der Doxorubicin-induzierten oralen Mukositis wirkt.

Während der protektive Effekt der Statine gegenüber Doxorubicin insbesondere durch die geringere Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und die reduzierte Apoptoserate zu erklären ist, wird die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen in Folge ionisierender Strahlung nicht gehemmt: Bei der Präinkubation humaner Endothelzellen mit Lovastatin vor der Behandlung mit ionisierender Strahlung beobachteten Nübel *et al.* eine reduzierte Apoptoserate. Die Entstehung und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen wurde jedoch nicht beeinflusst. [90] Auch die Inkubation von glatten Gefäßmuskelzellen mit Atovarstatin hat die strahlungsinduzierte Formation von DNA-Doppelstrangbrüchen nicht verhindern, jedoch die Reparatur beschleunigen können [91].

Die These, dass eine Präinkubation mit Statinen die Entstehung der strahlungsinduzierten oralen Mukositis verhindern kann, basiert insbesondere auf Untersuchungsergebnissen zur strahlungsinduzierten Enteropathie. Sowohl Pravastatin als auch Simvastatin haben im *in vivo* Mausmodell das Auftreten der strahlungsinduzierten Enteropathie nach lokaler fraktionierter Bestrahlung verringert [92, 93]. Insofern und unter Berücksichtigung der geringen Nebenwirkungen und der guten Kosteneffizienz erscheinen Statine als geeignete Radioprotektoren.

1.6 Statine beeinflussen die Funktion und die Wirkung der Rho-GTPasen

Bei den kleinen Rho-GTPasen handelt es sich um Ras-homologe, intrazelluläre Signaltransduktoren [94]. Sie sind elementar in vielfältige intrazelluläre Prozesse integriert. Hier spielen sie eine wichtige Rolle bei der Organisation des Aktinzytoskeletts und damit der Zellintegrität, regulieren die Mitose und aktivieren verschiedene Transkriptionsfaktoren [95-97]. Darüber hinaus sind die Rho-GTPasen in die Signaltransduktion und die zelluläre Antwort nach oxidativen und genotoxischen

Einleitung

Stressoren involviert [98]. Außerdem modulieren sie Teile der Reaktion gegenüber inflammatorischen Zytokinen [99].

Wie bereits beschrieben, entsteht die orale Mukositis durch vielfältige Schädigungsmechanismen, die neben DNA-Schäden auch die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies und die Rekrutierung von inflammatorischen Zellen umfassen [5]. Die Beteiligung der Rho-GTPasen an molekularen Prozessen, wie zum Beispiel der Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren NFκB, AP1 und STAT, die eine entscheidende Rolle bei der Stressantwort spielen, legt die Vermutung nahe, dass eine Modulation dieser kleinen GTPasen die Pathogenese der Mukositis beeinflussen könnte. [100]

Die Rho-GTPasen sind eine Subgruppe aus der Ras-Proteinfamilie, die im Allgemeinen für Wachstums- und Differenzierungsprozesse kodieren. Aufgrund dessen sind sie auch in die zentralen Mechanismen der Tumorentstehung involviert, wie die unkontrollierte Proliferation, das invasive Wachstum und die Metastasierung. [101] Ein bedeutender Vertreter der Rho-GTPasen ist Rac1. Rac1 hat unter anderem einen direkten Einfluss auf die Zellzyklusprogression durch die Regulation von Zyklinen, wie z.B. Cyclin D [102].

Die Aktivität der Rho-GTPasen ist dabei streng reguliert durch das gebundene Substrat: Durch die Bindung von GTP ist das jeweilige Protein in seiner aktiven, durch die Bindung von GDP in seiner inaktiven Form vorliegend [103]. Im Weiteren kann die Aktivität durch sogenannte Guaninaustauschfaktoren (GEF) reguliert werden, die die Abspaltung von GDP und stattdessen die Bindung von GTP fördern und damit zu einer schnelleren Aktivierung führen [104]. Für die Aktivierung der Rho-GTPasen ist die C-terminale Isoprenylierung essentiell [105]. Diese ist Voraussetzung für die intrazelluläre Membranverankerung, was wiederum Voraussetzung für die Aktivierung der Rho-GTPasen durch sogenannte GEFs an der inneren Zellmembran ist. Die für die Isoprenylierung notwendigen Isoprenreste, wie Farnesyl- und Geranylgeranylpyrophosphat, entstammen dem Mevalonatsignalweg, der unter anderem der Cholesterinbiosynthese dient.

Wie in Abb. 2 schematisch dargestellt, kann durch Statine eine pharmakologische Inhibition des Mevalonatsignalweges erfolgen. Sie hemmen mit der HMG-CoA-Reduktase das Schlüsselenzym. Wie Cicha *et al.* gezeigt haben, wird die Isoprenylierung der kleinen G-Proteine bei den gleichen Statinplasmaspiegeln beeinflusst, bei denen es auch zu einer Senkung des LDL-Cholesterins durch Statine kommt [106].

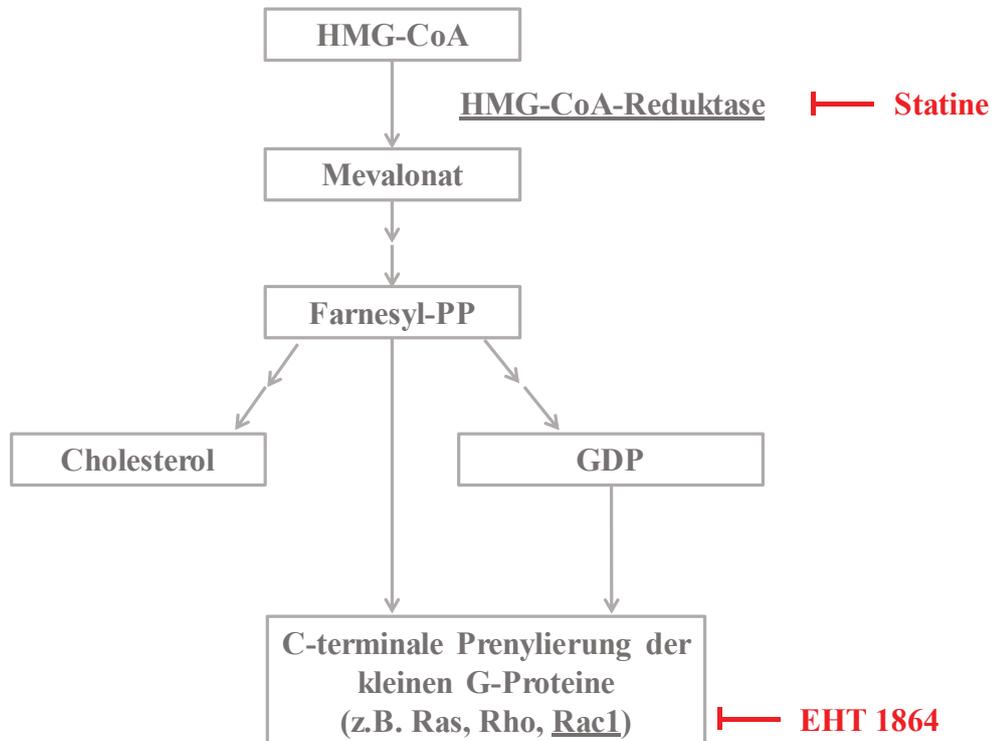


Abb. 2 Schematische Darstellung der Statin- und EHT 1864-Wirkung. Statine hemmen mit der HMG-CoA-Reduktase das Schlüsselenzym des Mevalonatsignalweges. EHT 1864 wirkt als direkter Rac1-Inhibitor.

Haydont *et al.* arbeiteten in ihrer Studie heraus, dass der Rho-ROCK-Signalweg ein möglicher Regulationsmechanismus für die positive Beeinflussung von strahlungsinduzierten intestinalen Komplikationen darstellt [107]. Die Inhibition des Rac1-Signalweges durch Lovastatin wurde als wirkungsvoller Mechanismus, die Kardiotoxizität von Doxorubicin herabzusetzen, durch Hülsenbeck *et al.* verifiziert [86].

Unter anderem auf der Basis dieser Untersuchungen ist die Hypothese aufzustellen, dass eine pharmakologische Hemmung der kleinen Rho-GTPasen die Pathogenese der Mukositis beeinflussen und damit einen Wirkungsmechanismus von Lovastatin darstellen könnte. Durch die Anwendung des spezifischen Rac1-Inhibitors EHT 1864 (Abb. 2) im Vergleich zu Lovastatin soll die Bedeutung von Rac1 in den nachfolgenden Experimenten untersucht werden.

1.7 Zielsetzung

Die orale Mukositis, auch als Stomatitis bezeichnet, stellt eine schwere, regelmäßig therapielimitierende Nebenwirkung einer Chemotherapie mit Doxorubicin und der Bestrahlung von Kopf-Hals-Tumoren dar. Für die Entstehung sind insbesondere die Schädigung der Keratinozyten und die hierdurch initiierte Entzündungsreaktion von Bedeutung. Ein Hinweis auf die herausragende Rolle der Keratinozyten gibt die bedingte Wirksamkeit von Palifermin, ein Keratinozytenwachstumsfaktor, gegenüber der Auslösung einer oralen Mukositis. Zurzeit steht als einziger Radioprotektor Amifostin zur Verfügung, der sich allerdings durch die geringe Plasmahalbwertszeit und die vielfältigen Nebenwirkungen als wenig praxistauglich herausgestellt hat [50]. Der Mukositisentstehung durch eine Tumorthherapie mit Doxorubicin kann zurzeit pharmakologisch noch nicht entgegengewirkt werden. Im Gegenteil, Doxorubicinformulierungen und Behandlungsschemata, die erfolgreich die Kardiotoxizität reduzierten, verstärkten die Entwicklung der Mundschleimhautentzündung [38, 39]. Schlussendlich bleibt sowohl bei einer Doxorubicin-, als auch bei einer Radiotherapie nur der Therapieansatz der *Best Supportive Care* in Form von speziellen Mundspüllösungen und einer Infektionsprophylaxe mit Amphotericin B und Antibiotika, um den Leidensdruck des Patienten zu reduzieren.

Bisherige Untersuchungen zeigten, dass die Inhibition der Rho-GTPasen eine protektive Wirkung auf verschiedene Normalgewebe bei einer Strahlen- oder Doxorubicinexposition ausübt [86, 90, 108]. Statine hatten einen positiven Einfluss auf die Doxorubicin-induzierte Hepatotoxizität sowie Kardiotoxizität und verminderten die pro-inflammatorische und profibrotische Wirkung ionisierender Strahlung auf Lunge, Leber, Intestinum und das hämatopoetische System *in vivo* [87, 109]. Außerdem konnte belegt werden, dass eine spezifische Inhibition der kleinen Rho-GTPase Rac1 vor den kardiotoxischen Effekten der Anthrazykline schützt [86].

Respektive der bereits gezeigten protektiven Effekte von Lovastatin auf vielfältige Nebenwirkungen von Doxorubicin und ionisierender Strahlung hat diese Arbeit das Ziel, potentielle zyto- und genoprotektive Effekte dieses Statins gegenüber der Mukositis-induzierenden Wirkung von ionisierender Strahlung und Doxorubicin zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde ein *in vitro* Modell mit HaCaT-Keratinozyten verwendet. Beobachtet wurde neben dem Einfluss auf die Viabilitätsreduktion und die Zellzyklusverteilung auch die Apoptose, die Proliferation und DNA-Reparaturmechanismen.

2 Material

2.1 Zelllinien und Medien

HaCaT (DMEM + 10 % FCS + 100 U/ml Penicillin + 100 g/ml Streptomycin)

DMEM, high glucose, D5796
Sigma
St. Louis, USA

DMEM, high glucose, D1145
Sigma
St. Louis, USA

FBS Superior, S0615
Merck
Darmstadt, GER

Penicillin-Streptomycin, P0781
Sigma
St. Louis, USA

2.2 Zellkulturmaterial

Cellstar Gewebekulturflasche, steril mit Filter, 250 ml, 75 cm
Greiner bio-one
Kremsmünster, GER

Cellstar tube (15 ml, 50 ml)
Greiner bio-one
Kremsmünster, GER

Cellstar Zellkulturplatte (6-Well und 96-Well)
Greiner bio-one
Kremsmünster, GER

Cellstar Zellkulturschale (60 mm, 35 mm)
Greiner bio-one
Kremsmünster, GER

Combitipps advanced, 5 ml
Eppendorf
Hamburg, GER

Cryo.s. Kryokonservierungsgefäße
Greiner bio-one
Kremsmünster, GER

Safe Lock tube, 2 ml
Eppendorf
Hamburg, GER

Safe Seal tube, 1,5 ml
Sarstedt
Nümbrecht, GER

Mr. Frosty Freezing Container
ThermoFisher Scientific
Waltham, USA

Multipipette Plus
Eppendorf
Hamburg, GER

Neubauer Improved Zählkammer
LO-Laboroptik Ltd
Lancing, GBR

Material

Pipettierhilfe Macroman	Gilson Middleton, USA
Pipettenspitzen (10, 100, 1000, 2500 μ l)	Eppendorf Hamburg, GER
Pipetman Classic	Gilson Middleton, USA
Pipetten	Eppendorf Hamburg, GER
Zellzähler	Upgreen Taichung, TPE

2.3 Chemikalien

Albumin Fraktion V (BSA)	Merck Darmstadt, GER
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck Darmstadt, GER
DMSO	Merck Darmstadt, GER
Doxorubicinhydrochlorid	Stada Arzneimittel Bad Vilbel, GER
EHT 1864	Tocris Bristol, GBR
Ethanol	Merck Darmstadt, GER
FCS	Sigma St. Louis, USA
Formaldehyd (37 %)	Carl Roth Karlsruhe, GER
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck Darmstadt, GER
Kaliumchlorid	Merck Darmstadt, GER
Kristallviolett	Merck Darmstadt, GER
Lovastatin	Merck Darmstadt, GER

Material

Methanol	Carl Roth Karlsruhe, GER
Natriumchlorid	Merck Darmstadt, GER
Propidiumiodid	Carl Roth Karlsruhe, GER
Resazurin-Natriumsalz	Sigma St. Louis, USA
RNase A (hitzeinaktiviert)	Qiagen Hilden, GER
Triton X-100	Sigma St. Louis, USA
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories Inc. Burlingame, USA

2.4 Lösungen

Blockiermedium	5 % BSA in PBST
BSA-Lösung	5 % Albumin Fraktion V (BSA) in PBS
EdU-Click 488	Base Click Neuried, GER
Formaldehyd-Lösung	4 % Formaldehyd in PBS
FCS-DMSO-Lösung	20 % DMSO 80 % FCS
Kristallviolett-Lösung	0,5 % Kristallviolett in ddH ₂ O
MTT-Lösung	5 mg/ml in PBS
NaCl/Pi-Puffer	154 mM NaCl 3,77 mM Na ₂ HPO ₄ 1,06 mM KH ₂ PO ₄ in ddH ₂ O
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 1,76 mM KH ₂ PO ₄ in ddH ₂ O pH 7,4
PBS high salt	263 mM NaCl in PBS
PBST	0,3 % Triton X-100 in PBS

Material

Propidiumiodid-Lösung	1 mg/ml in ddH ₂ O
Resazurin-NaCl/Pi-Lösung	0,1 % Resazurin-Stock-Lösung NaCl/Pi-Puffer
Resazurin-Stock-Lösung	440 mM Na-Resazurin Dimethylformamid
Resazurin-Arbeitslösung	10 % Resazurin-NaCl/Pi-Lösung DMEM (ohne Phenolrot)
RNeasy Mini Kit	Qiagen Hilden, GER
RNase A-Lösung	1 mg/ml in ddH ₂ O
SYBRH ROX Kit	Bioline London, GBR

2.5 Antikörper

Alexa Fluor 488 goat-anti-mouse IgG	Invitrogen Carlsbad, USA
Alexa Fluor 546 goat-anti-mouse IgG	Invitrogen Carlsbad, USA
Rabbit-anti-53BP1	Cell Signaling Technology Cambridge, GBR
Mouse-anti-H2.AX phospho (Ser139)	Merck Darmstadt, GER

2.6 Geräte

Analysewaage 3716 MP	Sartorius Göttingen, GER
Bio Vortex V1	PeqLab Erlangen, GER
Duchflusszytometer Accuri C6	BD Biosciences Franklin Lakes, USA
Eismaschine Icematic F90	Compact Electronics Wien, AUT
Feinwaage KERN Abs	Kern & Sohn GmbH Balingen, GER

Material

Gammacell 1000 Elite	Nordion International Inc. Ottawa, CAN
Fluoreszenzmikroskop BX43	Olympus Tokio, JPN
Horizontalschüttler Mini Rocker MR-1	PeqLab Erlangen, GER
Inkubator	Binder Tuttlingen, GER
Lichtquelle X-Cite Series 120Q	Excelitas Technologies Waltham, USA
Magnetrührer	Heidolph Schwabach, GER
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss Oberkochen, GER
Mikroskopkamera AxioCam ICm1	Zeiss Oberkochen, GER
Mini-Zentrifuge Spectrafuge	neoLab Heidelberg, GER
Plattenlesegerät Infinite F200	Tecan Männedorf, SUI
Plattenlesegerät Sunrise	Tecan Männedorf, SUI
QIAcube	Qiagen Hilden, GER
Pumpe Mini-Vac Power	PeqLab Erlangen, GER
Real-Time System CFX96	BioRad Hercules, USA
Spektrophotometer NanoVue Plus	GE Healthcare Chalfont St. Giles, GBR
Sterilbank Herasafe Save 20	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA
Thermocycler C1000	BioRad Hercules, USA
Thermomixer compact	Eppendorf Hamburg, GER
Vortex Genie 2	Scientific Industries Bohemia, USA

Material

Wasserbad W22	Labortechnik Medingen Arnsdorf, GER
Wasserdeionisierungsanlage Milli-Q Advantage A10	Merck Darmstadt, GER
Zentrifuge Multifuge X1R	Thermo Fisher Scientific Waltham, USA

2.7 Computersoftware

CellSense Dimension 1,6	Olympus Tokio, JPN
Accuri CFlow Plus Software	BD Bioscience Franklin Lakes, USA
CFX Manager	BioRad Hercules, USA
i-control	Tecan Männedorf, SUI
Image J	Wayne Rasband (NIH) Bethesda, USA
Microsoft Office	Microsoft Redmond, USA
Prism 6	Graph Pad La Jolla, USA
Zen 2012 lite	Zeiss Oberkochen, GER

3 Methoden

3.1 Zellkultivierung

Die Kultivierung der HaCaT-Keratinocyten erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre. DMEM versetzt mit 10 % hitzeinaktiviertem (105 min bei 56 °C) FCS diente als Kulturmedium. Die Zugabe von 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin wirkte präventiv gegenüber einer bakteriellen Kontamination. Die Zellen wurden mit einer Zellzahl von 1-2 x 10⁶ Zellen in einer T75 Zellkulturflasche in 15 ml des oben beschriebenen Mediums ausgesät und für 2-3 Tage kultiviert. Bei 90 % Konfluenz wurde der Zellrasen nach dem Entfernen des Mediums zunächst mit 1 ml Trypsin gewaschen und zum Auslösen aus der Kulturflasche in den folgenden 15 min mit 2 ml Trypsin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 8 ml Medium resuspendiert. Der Zellzahlbestimmung diente die Entnahme von 10 µl Zellsuspension, welche in eine Neubauer-Zählkammer überführt und ausgezählt wurden. Nach der Zentrifugation der Zellsuspension bei 300 x g und anschließender Abnahme des Überstandes konnte die gewünschte Zellzahl in einer T75 Zellkulturflasche ausgesät werden.

3.2 Kryokonservierung von Zellen

Für die Kryokonservierung der Zellen wurde 1 ml FCS-DMSO-Lösung (20 % DMSO) bei Raumtemperatur vorgelegt, 1 ml der Zellsuspension (1-2 x 10⁶ Zellen/ml) hinzugegeben und mehrfach invertiert. Die kontrollierte Abkühlung erfolgte mit einer Rate von 1 K/min bis -80 °C mit Hilfe des Kühlbehälters Mr. Frost Freezing Container. Für die dauerhafte Konservierung wurden die Zellen am Folgetag in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff direkt in ein auf 37 °C vorgewärmtes Wasserbad gegeben. Sobald lediglich kleinste Eiskristalle sichtbar waren, wurde die Zellsuspension unverzüglich in vorgewärmtes Medium pipettiert. Mit dem Ziel das zytotoxische DMSO aus der Zellsuspension zu entfernen, erfolgte die Zentrifugation der Suspension mit 300 x g für 5 min mit anschließender Entfernung des Überstandes. Nach dem Resuspendieren des Pellet wurden die Zellen in einer T75 Zellkulturflasche mit einem Mediumwechsel am Folgetag kultiviert.

3.3 Bestimmung der Zellviabilität

3.3.1 Resazurin-Reduktionstest

Der Resazurin-Reduktionstest ist ein einfaches Verfahren, um die Zytotoxizität einer Substanz zu testen. Grundlage ist der Umsatz von Resazurin zum fluoreszierenden Resorufin durch mitochondriale, mikrosomale und zytosolische Oxidoreduktasen. Dabei korreliert die Fluoreszenz mit der Zellviabilität. Resazurin und seine Metabolismusprodukte haben keine zytotoxischen Effekte, was es erlaubt, im Anschluss an den Test weitere Experimente mit den Zellen durchzuführen. [110, 111]

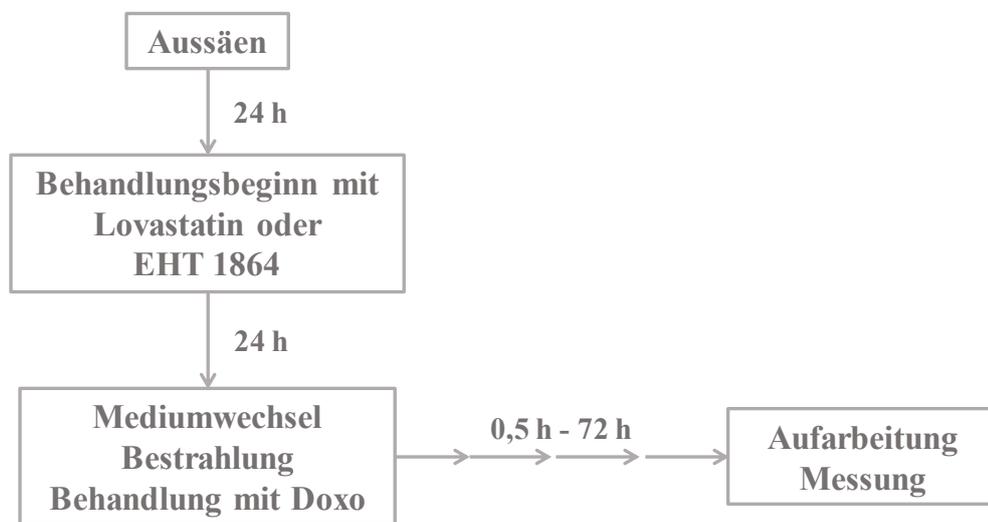


Abb. 3 Behandlungsschema der HaCaT-Zellen für sämtliche Experimente. Ein Mediumwechsel wurde grundsätzlich alle 24 h durchgeführt. Die angegebenen Zeitintervalle begannen bei den Experimenten mit EHT 1864 und Doxorubicin jeweils nach dem Ende der Pulsbehandlung, für Lovastatin-behandelte, bestrahlte Zellen und lediglich bestrahlte Zellen nach der Bestrahlung und für die Kontrollen 48 h nach dem Aussäen und damit nach dem zweiten Mediumwechsel.

Zur Testung der Viabilität bestrahlter Zellen wurden 35.000 Zellen in 35 mm Zellkulturschalen in 3 ml Medium ausgesät, nach 24 h optional vorbehandelt und weitere 24 h später bestrahlt. Die Messzeitpunkte beziehen sich auf den Zeitraum zwischen der Bestrahlung und der Messung (Abb. 3). Die Resazurin-Arbeitslösung wurde direkt vor der Anwendung aus der Stocklösung hergestellt. Hierzu wurde 1 ml Resazurin-NaCl/Pi-Lösung (Stocklösung) mit 9 ml DMEM ohne Phenolrot verdünnt. Das Hinzugeben von 1 ml Resazurin-Arbeitslösung pro 35 mm Schale erfolgte bei abgedunkeltem Licht, nachdem das Nährmedium abgenommen worden war. Es folgte eine Inkubation für 90 min bei 37 °C im Inkubator. Für die Fluoreszenzmessung wurde der Überstand aus den Schalen

Methoden

am Ende der Inkubationszeit in eine 96 Well-Platte überführt und die Fluoreszenz mit Hilfe des Plattenlesegerätes Infinite F200 gemessen.

Für die Untersuchung der Zytotoxizität von Doxorubicin und die Modulation durch EHT 1864 und Lovastatin wurden die Zellen mit einer Zellzahl von 5.000 Zellen in 200 µl Medium in 96-Well Platten ausgesät. Nach 24 h wurde vorbehandelt und nach weiteren 24 h eine 2 h-Pulsbehandlung mit Doxorubicin durchgeführt. Die Messzeitpunkte beziehen sich auf den Zeitraum zwischen dem Ende der Doxorubicinbehandlung und der Messung. Ebenso wie bei den bestrahlten Zellen wurde dann das Medium abgesaugt und 100 µl Resazurin-Arbeitslösung hinzugegeben und inkubiert. Die 96-Well Platten konnten ohne weiteren Arbeitsschritt nach der Inkubation in das genannte Plattenlesegerät gegeben und die Fluoreszenzmessung durchgeführt werden.

Die Fluoreszenzmessung erfolgte bei 535 nm Exzitation und 590 nm Emission. Außerdem wurde die alleinige Fluoreszenz der Resazurin-Arbeitslösung bestimmt. Zur Auswertung wurden die Durchschnittswerte der durchschnittlich 6 Replikate gebildet und zunächst die Fluoreszenzaktivität der Resazurinkontrolle von der Fluoreszenzaktivität der übrigen Bedingungen subtrahiert. Die relative Zellviabilität ist der Quotient aus Fluoreszenzaktivität der Behandlung und der Aktivität der unbehandelten Kontrolle.

3.3.2 MTT-Test

Der MTT-Test diene ebenso wie der Resazurin-Reduktionstest der Überprüfung der Zellviabilität. Das Prinzip beruht auf der Umsetzung des hellgelben MTT zu unlöslichen, dunkelblauen Formazankristallen. Im Gegensatz zum Resazurin-Reduktionstest wird im Anschluss nicht die Fluoreszenz, sondern die Absorption mit Hilfe eines Plattenlesegeräts gemessen. Es besteht ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Menge der anfallenden Formazankristalle und der Anzahl vitaler Zellen. Gleichzeitig produzieren aktive Zellen mehr Formazannadeln als im Zellzyklus arretierte Zellen. Somit kann auch die Aktivität nicht proliferierender Zellen, ebenso wie beim Resazurin-Reduktionstest, bestimmt werden. [112]

Zur Testung der Viabilität bestrahlter Zellen wurden diese mit einer Zelldichte von 5000 Zellen/Well in einer 96-Well Platte im Anschluss an die Bestrahlung ausgesät. Zu den Messzeitpunkten wurden 40 µl MTT-Lösung direkt zu den schon vorhandenen 200 µl Medium in die Vertiefungen gegeben. Es schloss sich eine dreißigminütige Inkubationszeit

an, an deren Ende unter dem Mikroskop blaue Formazankristalle in den Zellen erkennbar waren. Der Überstand wurde mit einer Multipipette abgenommen und anschließend 100 µl DMSO in jede Vertiefung pipettiert. Bis zur vollständigen Lösung der Formazankristalle wurden die 96-Well Platten auf einem Horizontalschüttler inkubiert, bevor bei einer Wellenlänge von 560 nm die Absorptionsmessung im Tecan Sunrise Plattenlesegerät erfolgte. Die Zellen für die Doxorubicinbehandlung wurden noch unbehandelt in den 96-Well Platten ausgesät, sodass kein weiteres Umsetzen notwendig war. Die weiteren Schritte wurden simultan zu denen der bestrahlten Zellen durchgeführt.

3.4 Durchflusszytometrische Bestimmung der Zellzyklusverteilung

Mit Hilfe der durchflusszytometrischen Analyse propidiumiodidgefärbter Zellen besteht die Möglichkeit, die Distribution der Zellen in die verschiedenen Zellzyklusphasen bzw. die SubG1-Fraktion zu bestimmen. Dabei wirkt Propidiumiodid als DNA-interkalierender Fluoreszenzfarbstoff. Der DNA-Gehalt variiert in Abhängigkeit von der Zellzyklusphase, sodass über die Fluoreszenzmessung eine Zuordnung zu bestimmten Phasen des Zellzyklus möglich ist. In der G₀/G₁-Phase hat die Zelle einen einfachen Chromosomensatz, während in der G₂/M-Phase ein doppelter Chromosomensatz vorliegt. Die S-Phase ist hinsichtlich des DNA-Gehalts, der zwischen dem einfachen und doppelten Chromosomensatz liegt, inhomogen und daher nicht genau zu definieren mit dieser Methode. Während der Nekrose und der Apoptose entstehen im Rahmen der Kernkyphose DNA-Fragmente, sodass als SubG1-Fraktion alle Zellen mit einem inkompletten Chromosomensatz definiert sind. [113]

Für eine optimale Messung müssen die Zellen im Durchflusszytometer einzeln den Laserstrahl passieren. Durch eine Beschleunigung des Flüssigkeitsstroms entspricht die Tropfengröße im Bereich des Detektors lediglich noch der Größe einer einzelnen Zelle. Dieser Vorgang wird als hydrodynamische Fokussierung bezeichnet. Detektiert werden das Vorwärtsstreulicht (FSC) als Maß für die Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (SSC) als Maß für die Zellgranularität, sowie die Fluoreszenz. [114-116]

Für die Zellzyklusanalyse wurden 100.000 Zellen für die Messung 48 h nach der Schädigung oder 80.000 Zellen für die Messung 72 h nach der Schädigung in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät. Am folgenden Tag wurde optional mit EHT 1864 oder

Lovastatin vorbehandelt und weitere 24 h später bestrahlt bzw. mit Doxorubicin behandelt. Nach den oben genannten Zeitintervallen erfolgte die Aufarbeitung. Hierfür wurde der Überstand in Falcons überführt, die Zellen mit Trypsin gewaschen, anschließend trypsiniert und ebenfalls in das entsprechende Falcon überführt. Der Überstand musste zwingend in das oben genannte Falcon überführt werden, damit nicht bereits ablöste Zellen verloren gingen. Es schlossen sich zwei Waschschriffe an, jeweils bestehend aus einer Zentrifugation (reduzierte Bremse, 300 x g, 5 min, 4 °C) und anschließendem Resuspendieren in 1 ml Medium und beim zweiten Waschschriff in 100 µl Medium. Bis zur Messung wurden die Zellen in 2 ml 80 % Ethanol resuspendiert und bei -20 °C gelagert. Vor der Messung musste wiederum zentrifugiert werden (reduzierte Bremse, 500 x g, 10 min, 4 °C), um das Ethanol zu entfernen. Nach dem Absaugen des Überstandes schloss sich eine einstündige Inkubation mit DNase-freier RNase (RNase A Lösung) bei Raumtemperatur an, um eine Beeinflussung der Messergebnisse durch RNA zu verhindern. Vor der Messung wurden 367 µl Propidiumiodid-Lösung hinzugegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Für die Messung (mindestens 10.000 Ereignisse, Kanal 2: 585/40 nm) war es unbedingt erforderlich, die Zellsuspension erneut zu resuspendieren, bevor sie in 2 ml Reaktionsgefäße überführt wurde.

3.5 Immunzytochemie: Ko-Lokalisation von γ H2AX und 53BP1 Foci

Die immunzytochemische Färbung des phosphorylierten Histons 2AX (γ H2AX) und des p53-bindenden Proteins 1 (53BP1) dient der Quantifizierung potentieller DNA-Doppelstrangbrüche. Entsteht durch ionisierende Strahlung oder andere genotoxische Einflüsse ein DNA-Doppelstrangbruch, bindet im Schadensbereich das durch PI3-Kinasen am Serin 139 phosphorylierte und damit aktivierte Histon H2AX [117]. Typische Vertreter der PI3-Kinasen sind unter anderem ATM und ATR [118]. Parallel wird 53BP1 aus dem Zytoplasma rekrutiert und der Komplex aus γ H2AX und 53BP1 bildet eine funktionelle Einheit. Diese ko-lokalisierten γ H2AX- und 53BP1-Foci werden als spezifische Marker für DNA-Doppelstrangbrüche eingeordnet. [119]

Für die immunzytochemische Färbung wurden 400.000 Zellen in 60 mm Zellkulturschalen ausgesät, in denen zuvor zwei Deckgläschen vorgelegt worden waren. Am nächsten Tag erfolgte entweder die Vorbehandlung mit Lovastatin oder ein Mediumwechsel bei den Kontrollen. Als Kontrollen dienten unbehandelte und mit Lovastatin behandelte Zellen.

Nach weiteren 24 h wurde die Doxorubicinbehandlung durchgeführt oder es erfolgte die Bestrahlung der Zellen. Die Aufarbeitung der Zellen geschah 2 h und 8 h nach Beginn der Doxorubicinbehandlung oder 0,5 h und 8 h nach der Bestrahlung. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit 4 % Formaldehydlösung (15 min bei Raumtemperatur) fixiert und anschließend mindestens 24 h in Methanol bei -20 °C gelagert. Um unspezifische Antikörperbindungsreaktionen auszuschließen, wurden diese Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation in 5 % BSA-PBS-Lösung blockiert. Im nächsten Schritt wurden die Zellen über Nacht in einer feuchten Kammer mit dem monoklonalen 53BP1 Antikörper (*rabbit*) und dem monoklonalen γ H2AX Antikörper (*mouse*) inkubiert. Die Antikörper waren je 1:500 in PBST verdünnt. Nach mehreren Waschschritten in PBS folgte eine 90-minütige Inkubation mit den fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern (Alexa Fluor *goat anti mouse* 488 nm und Alexa Fluor *goat anti rabbit* 546 nm). Das zum Eindeckeln verwendete Vectashield Mounting Medium enthielt bereits DAPI, welches die Kernfärbung bewirkte. Bis zur Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskop wurden die Objektträger bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Zur Quantifizierung der Foci sind pro Bedingung mindestens 50 Zellen herangezogen und lediglich die ko-lokaliserten Foci gezählt worden.

3.6 Bestimmung der Zellproliferation: EdU-Inkorporation

Die Bestimmung der Zellproliferation durch die EdU-Färbung beruht auf dem Einbau des Fluoreszenz-gekoppelten Thymidinanalogons EdU während der S-Phase. Es ist somit anders als bei der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse möglich, den Anteil der Zellen in der S-Phase zu quantifizieren. Die EdU-Färbung ist im Gegensatz zu der BrdU-Färbung nicht antikörperbasiert. Aus diesem Grund muss keine Denaturierung der DNA erfolgen, um das inkorporierte Nukleosid zu detektieren. Die EdU-Detektion beruht auf einem Klick-Verfahren, bei dem ein Fluorophor-gekoppeltes Azid an das inkorporierte EdU bindet. [120]

Für die Versuche wurden 100.000 Zellen in 35 mm Zellkulturschalen ausgesät, in denen jeweils zwei Deckgläschen vorgelegt waren. Die Zellen wurden analog zu den vorangegangenen Experimenten 24 h nach dem Aussäen für 24 h mit Lovastatin vorbehandelt und im Anschluss einer zweistündigen Pulsbehandlung mit Doxorubicin unterzogen oder mit 2 Gy bestrahlt. Einen Tag nach der Doxorubicinbehandlung oder der

Bestrahlung erfolgte eine 20-minütige Inkubation mit 10 μ M EdU, das zuvor in FCS-freiem DMEM gelöst worden war. Zum einen bietet FCS eine Vielzahl von unspezifischen Bindungsstellen, an die das EdU hätte binden können. Zum anderen wäre es möglicherweise zu einer fälschlicherweise gesteigerten Proliferation während der EdU-Inkubation durch die Wachstumsfaktoren in FCS-haltigem Medium gekommen. Es folgte die Fixierung der Zellen (4 % Formaldehydlösung, Raumtemperatur, 15 min) und eine Inkubation in Methanol (20 min, -20 °C). Vor dem Auftragen der Reaktionslösung mussten mehrere Waschschrte durchgeführt werden. Der erste Waschschrte in PBS diente dem gänzlichen Entfernen des Methanols. Der anschließende Waschschrte mit PBST bewirkte das Permeabilisieren der Zellmembran. Die Reaktionslösung wurde nach Herstellerangaben angesetzt. Die Deckgläschen wurden mit jeweils 50 μ l der Reaktionslösung für 30 Minuten inkubiert (Raumtemperatur, feuchte Kammer, im Dunkeln). Nach erneuten Waschschrten in PBS und in PBST erfolgte das Eindeckeln mit dem Vectashield Mounting Medium. Dieses enthielt bereits DAPI, welches die Kernfärbung bedingte.

Bis zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung wurden die Objektträger bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Für die Quantifizierung der als EdU positiv bewerteten Zellen wurden je Bedingung 500 Zellen gezählt, wobei zwischen drei verschiedenen Zuständen und letztlich zwei Bedingungen zu unterscheiden war. Zum einen eindeutig EdU-negative Zellen, die sich blau darstellten und zum anderen eindeutig EdU-positive Zellen, die grün waren. Außerdem zeigten sich Zellen mit leichter Grünfärbung, die ebenfalls als EdU-negativ bewertet wurden.

3.7 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion

3.7.1 RNA-Isolation aus Zellen

Gemäß dem Behandlungsschema der vorangegangenen Untersuchungen erfolgte 24 h nach dem Aussäen optional die 24-stündige Präinkubation mit Lovastatin und die anschließende Bestrahlung mit Mediumwechsel. Es wurde mit einer Dosis von 10 Gy bestrahlt. Als Kontrollen wurden unbehandelte und lediglich mit Lovastatin behandelte Zellen verwendet.

Nach einer erneuten Inkubationsdauer von 24 h begann die RNA-Isolation zunächst mit einem Waschschrift in PBS, bevor je 60 mm Kulturschale 350 µl RLT/DTT-Puffer hinzugegeben wurden. Die Zellen wurden mittels Spatel aus den Kulturschalen gelöst. Es schloss sich ein kurzes Resuspendieren und Überführen der Zellsuspension in Reaktionsgefäße, sowie die Zugabe des DNase-RDD-Puffers an.

Für die Aufreinigung der RNA wurde der vollautomatisch arbeitende QiaCube mit dem RNeasy Mini Kit bestückt und eine Elution in 30 µl RNase-freiem Wasser ausgewählt. Pro Bedingung standen drei Zellkulturschalen zur Verfügung, aus denen jeweils die RNA extrahiert wurde. Vor dem Zusammenführen der RNA-Proben gleicher Bedingungen diente die Messung des RNA-Gehalts mit dem Photospektrometer NanoVue der Sicherstellung eines ausreichenden RNA-Gehalts in den einzelnen Proben. Die gewonnene RNA wurde direkt weiterverwendet oder optional bei -80 °C eingelagert.

3.7.2 cDNA-Synthese

Da für die Polymerase-Kettenreaktion cDNA notwendig ist, musste diese zunächst mit Hilfe einer reversen Transkriptase synthetisiert werden. Der Mastermix bestehend aus zehnfach reverse Transkriptase-Puffer, dNTP Mix, oligo-dT Primer, RNase-Inhibitor und reverser Transkriptase wurde jeweils neu angesetzt. Die Reaktionsansätze aus Mastermix, RNA und RNase-freiem Wasser sind für 60 min bei 37 °C in einem Thermomixer inkubiert worden. Da die Reaktion durch die Zugabe der reversen Transkriptase startete, erfolgte die Zugabe erst kurz vor der Verwendung des Mastermixes. Die synthetisierte cDNA konnte unmittelbar verwendet oder optional bei -20 °C eingelagert werden.

3.7.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der *in vitro* Amplifikation von DNA mit Hilfe einer thermostabilen Polymerase, den entsprechenden Primern und Desoxyribonukleotiden. Bei der klassischen Polymerase-Kettenreaktion wird das Produkt durch Gelektrophorese entsprechend der Größe in einem Agarose-Gel aufgetrennt. Die gleichzeitig aufgetragene Kontrolle enthält dabei DNA-Fragmente mit einer bekannten Basenpaaranzahl, sodass eine ungefähre Bestimmung der amplifizierten Fragmentgröße in den Proben möglich ist. [121]

Methoden

Hier wurde die deutlich zeitsparendere quantitative Echtzeit-PCR angewendet. Bei dieser erfolgt die Quantifizierung parallel zum PCR-Zyklus mittels einer Fluoreszenzmessung [122].

Zur Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR ist das SYBR Hi-ROX Kit verwendet worden. Neben einer thermostabilen Polymerase und dNTPs enthält es SYBR Green I. Dabei handelt es sich um einen unsymmetrischen Cyaninfarbstoff, der in die DNA-Doppelstränge interkaliert. Dieser Komplex absorbiert zum einen blaues Licht (494 nm) und zum anderen emittiert er grünes Licht (521 nm). Somit kann parallel zu den Zyklen ständig die Fluoreszenz gemessen und damit die entstandene DNA-Menge bestimmt werden. [123]

Die Durchführung der quantitativen Echtzeit-PCR hatte zum Ziel eine möglichst große Anzahl von Genen als Ursache der gezeigten Lovastatineffekte auf die zytotoxische Wirkung der ionisierenden Strahlung zu verifizieren. Aus diesem Grund wurde eine 96-Well Platte verwendet, in deren Vertiefungen dementsprechend 96 verschiedene Primerpaare vorgelegt waren (siehe 7.1). Die Primer bildeten zahlreiche Gene ab, die bei der DNA-Schadenantwort typischerweise aktiv sind. Die Firma Sigma Aldrich designte im Auftrag die Primer, wobei der Schmelzpunkt von etwa 60 °C, eine Länge von 20 Basen und eine Produktgröße von 50-200 Basenpaaren als Kriterien vorgegeben waren.

Der Reaktionsansatz in den einzelnen Wells setzte sich jeweils zusammen aus 8 µl Primer, 10 µl SYBR Green I und 2 µl cDNA-Lösung mit einer Konzentration von 10 ng/µl. Für die Polymerase-Kettenreaktion wurde der BioRad C1000 Thermozykler in Verbindung mit dem CFX96 Echtzeitsystem zur Messung der Fluoreszenz genutzt.

Der erste Zyklus bestand lediglich aus einer Erhitzung auf 95 °C für 10 Minuten mit dem Ziel der Reaktionsaktivierung. Die folgenden 40 Zyklen umfassten für jeweils 15 Sekunden das Erhitzen auf 95 °C für die Denaturierung des Doppelstranges, das Abkühlen auf 55-60 °C zum Binden der Primer und dem Erhitzen auf 72 °C für die Replikation.

Im Anschluss wurden mit Hilfe des Softwareprogrammes CFX Manager die Ergebnisse ausgewertet und graphisch dargestellt. Als Referenz für die Quantifizierung dienten ACTB und GAPDH. Für die Auswertung sind sämtliche Gene aus der Analyse entfernt worden, die erst oberhalb des 35. Zyklus repliziert wurden. Der Ct-Wert wurde auf 2,0 festgesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Die Messergebnisse von Resazurin-Reduktionstest und MTT-Test sind äquivalent bei den HaCaT-Keratinocyten

Der Resazurin-Reduktionstest dient der Untersuchung des zytoprotektiven Potentials des Modulators Lovastatin gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Doxorubicin und ionisierender Strahlung. Mit Hilfe eines Photometers wird der Resazurinumsatz bestimmt, der ein proportionales Maß für die Zellviabilität darstellt [111]. Eine erniedrigte Viabilität kann durch unterschiedliche Ursachen bedingt sein, zum einen durch Apoptose und Nekrose, zum anderen durch Seneszenz oder Proliferationshemmung. Dabei stellen Apoptose und Nekrose eine organisierte und eine nicht-organisierte Form des Zelltodes dar. Die Seneszenz hingegen beschreibt eine nicht mehr teilungsfähige, aber weiterhin stoffwechselaktive Zelle. [124]

Häufiger angewendet als der Resazurin-Reduktionstest wird der MTT-Test zur Untersuchung der Zellviabilität. Während beim Resazurin-Reduktionstest die Fluoreszenz bestimmt wird, ist beim MTT-Test die Absorption entscheidend [112]. Allerdings haben bereits Hamid *et al.* bei einer vergleichenden Viabilitätsbestimmung mit dem MTT-Test und dem Resazurin-Reduktionstest äquivalente Ergebnisse erzielt [125]. Um sicherzustellen, dass auch bei den HaCaT-Keratinocyten mittels Resazurin-Reduktionstest dieselben Ergebnisse wie mit dem MTT-Test erzielt werden, wurden zunächst vergleichende Analysen bei identischen Bedingungen durchgeführt. Zu diesem Zweck erfolgte die Behandlung der Zellen 24 h nach dem Aussäen mit unterschiedlichen Dosen ionisierender Strahlung und die Viabilität wurde mit beiden Testmethoden jeweils 24 h, 48 h und 72 h nach der Behandlung bestimmt.

Abb. 4 stellt die Zellviabilität in Abhängigkeit von der Strahlendosis dar, jeweils untersucht mit dem MTT- und dem Resazurin-Reduktionstest zu den drei eben genannten Messzeitpunkten. Es ist festzustellen, dass beide Testverfahren nahezu identische Messergebnisse ergaben. Aufgrund der leichteren Durchführbarkeit wurde die Entscheidung getroffen, sämtliche Viabilitätsuntersuchungen mit Hilfe des Resazurin-Reduktionstests durchzuführen.

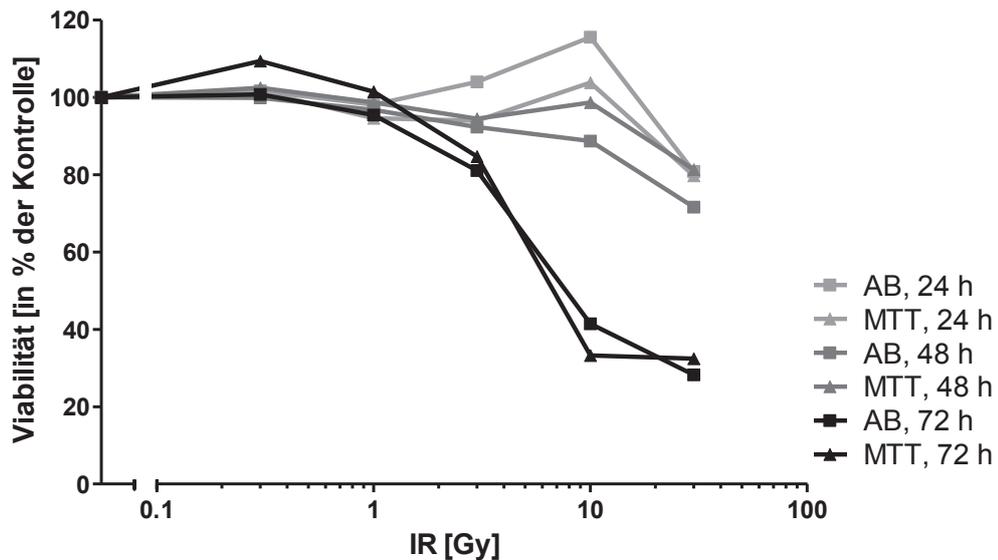


Abb. 4 Vergleich der Viabilitätsmessung bestrahlter HaCaT-Zellen mittels Resazurin-Reduktionstest und MTT-Test. Die Applikation der ionisierenden Strahlung erfolgte als Einzeldosis 24 h nach dem Aussäen der HaCaT-Zellen. Der Messzeitpunkt (24 – 72 h) bezieht sich auf den Zeitraum nach der Bestrahlung. Normalisiert wurden die Ergebnisse auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle ($\cong 100\%$). Für jede Bedingung wurde der Mittelwert aus 6 Replikaten gebildet. Dargestellt ist das Ergebnis eines Experiments.

4.1.1 Bestimmung des zytotoxischen Potentials der Agenzien und Modulatoren

Zur Dosisfindung vor der Ko-Behandlung wurde in einem ersten Schritt zu Beginn der Versuchsreihe das zytotoxische Potential der verwendeten Agenzien (Doxorubicin, Lovastatin, EHT 1864) und der ionisierenden Strahlung untersucht.

Es erfolgte zunächst das Aussäen der Zellen, bevor 24 h später die Behandlung stattfand. Die Inkubationszeit der Zellen mit Doxorubicin wurde auf 2 h, die mit Lovastatin auf 24 h und die mit EHT 1864 auf 4 h festgesetzt. An drei verschiedenen Zeitpunkten, 24 h, 48 h und 72 h nach der Behandlung wurde die Viabilität bestimmt. Die Festlegung der Strahlendosis und der Konzentration der Agenzien für alle nachfolgenden Experimente basierte auf den Ergebnissen dieser vorgeschalteten Viabilitätsmessungen.

In Abb. 5 ist die Viabilitätsabnahme durch ionisierende Strahlung in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Die HaCaT-Keratinocyten zeigten auch bei hohen Strahlendosen eine geringe Viabilitätsreduktion, wobei sich die zytotoxischen Effekte auch dann erst am dritten Tag nach der Bestrahlung eindeutig präsentierten. Dabei lag die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) 72 h nach der Bestrahlung bei etwa 8 Gy. Für alle nachfolgenden Experimente erschienen 3 Gy, 10 Gy und 30 Gy als ideale Strahlendosen, um die mögliche zytoprotektive Wirkung der Modulatoren zu untersuchen.

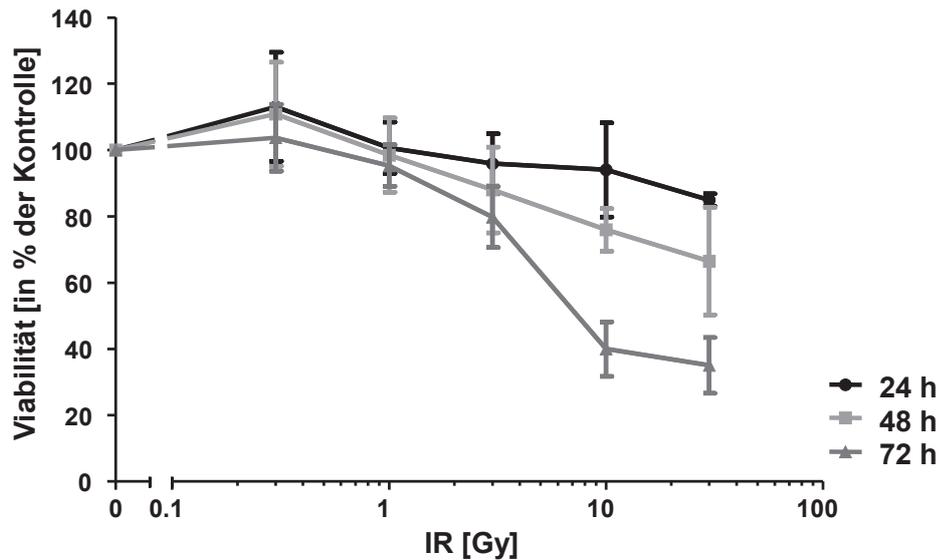


Abb. 5 Bestimmung des zytotoxischen Effekts von ionisierender Strahlung auf die HaCaT-Zellen. Die Applikation der ionisierenden Strahlung erfolgte als Einzeldosis 24 h nach dem Aussäen der HaCaT-Zellen. Der Messzeitpunkt (24 – 72 h) bezieht sich auf den Zeitraum nach der Bestrahlung. Normalisiert wurden die Ergebnisse auf die jeweilige Kontrolle ($\cong 100\%$). Für jede Bedingung wurde der Mittelwert aus 6 Replikaten gebildet. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten.

In Abb. 6 ist die Viabilitätsabnahme der HaCaT-Zellen durch die Behandlung mit Doxorubicin in Abhängigkeit von der Zeit aufgetragen. Die Dosiswirkungskurve stellte sich sigmoidal dar. In der Konsequenz konnte für jeden Messzeitpunkt eine eindeutige IC_{50} bestimmt werden. Außerdem war für sämtliche Messzeitpunkte eine Konzentration zu eruieren, die zur nahezu 100 % Reduktion der Viabilität führte.

Für den Beobachtungszeitraum von 24 h lag die IC_{50} bei etwa $2 \mu\text{M}$, nach 48 h betrug sie etwa $0,2 \mu\text{M}$ und nach 72 h etwa $0,07 \mu\text{M}$. Für die nachfolgenden Experimente wurden die Doxorubicinkonzentrationen $0,1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ und $7 \mu\text{M}$ ausgewählt, da diese an allen Messzeitpunkten biologisch relevante Effekte bewirkten. Als Endpunkt konnte die 100 % Reduktion der Viabilität bei einer Doxorubicinkonzentration von $7 \mu\text{M}$ beobachtet werden.

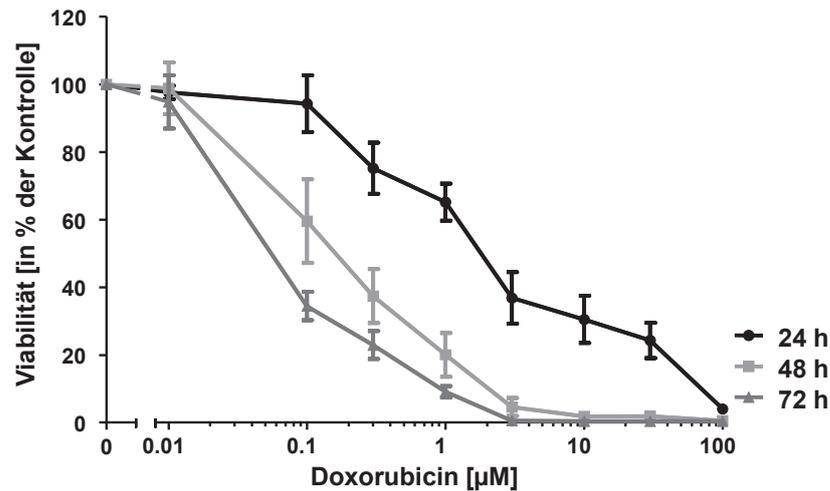


Abb. 6 Bestimmung des zytotoxischen Effekts von Doxorubicin auf die HaCaT-Zellen. Die Inkubation mit Doxorubicin erfolgte 24 h nach dem Aussäen der HaCaT-Zellen für 2 h. Der Messzeitpunkt (24 – 72 h) bezieht sich auf den Zeitraum nach der Behandlung. Normalisiert wurden die Ergebnisse auf die jeweilige Kontrolle ($\hat{=}$ 100 %). Für jede Bedingung wurde der Mittelwert aus 6 Replikaten gebildet. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten.

Auch für Lovastatin und EHT 1864, die in den anschließenden Experimenten als mögliche zytoprotektive Modulatoren eingesetzt werden sollten, wurde die später verwendete Konzentration im Rahmen von vorgeschalteten Viabilitätsmessungen festgelegt.

Abb. 7 bildet die Dosis-Wirkungsbeziehung einer 24-stündigen Lovastatinbehandlung ab. Dargestellt ist die Viabilität in Abhängigkeit von der Lovastatindosis. Eine Viabilitätsreduktion war im Wesentlichen erst 48 h und 72 h nach der Behandlung messbar. Zu diesem Zeitpunkt stellte sich der Zusammenhang zwischen Lovastatinkonzentration und Reduktion der Viabilität nahezu linear dar. Auffallend war, dass die Viabilitätsabnahme nach 72 h für sämtliche getestete Lovastatinkonzentrationen geringer ausfiel als nach 48 h.

Für den Modulator Lovastatin wurde eine Wirkdosis, die eine moderate Abnahme der Viabilität zwischen 10 % und 20 % in der Zellpopulation bedingte, festgelegt. Diese betrug für den Zeitraum zwischen 48 h und 72 h etwa 30 μ M und wurde in den nachfolgenden Experimenten als Lovastatinkonzentration für die 24-stündige Vorbehandlung ausgewählt. Idealerweise sollte die Wirkdosis eines möglichen zytoprotektiven Modulators in einem gering bzw. gerade noch tolerierbaren toxischen Bereich liegen, um direkt den Effekt der maximal anwendbaren Konzentration zu untersuchen.

Ergebnisse

Auf Grundlage der Messergebnisse einer transienten Lovastatinvorbehandlung (Abb. 7) wurde eine Konzentration von 10 μM zur Untersuchung möglicher zytoprotektiver Effekte einer Dauerbehandlung mit Lovastatin festgelegt.

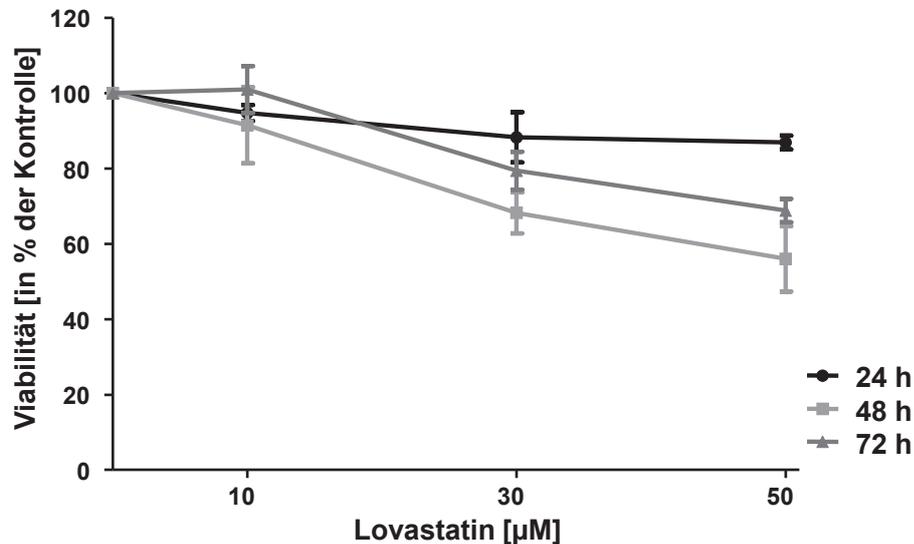


Abb. 7 Bestimmung des zytotoxischen Effekts von einer Vorbehandlung mit Lovastatin auf die HaCaT-Zellen. Die Inkubation mit Lovastatin erfolgte 24 h nach dem Aussäen der HaCaT-Zellen für ein Intervall von 24 h. Der Messzeitpunkt (24 – 72 h) bezieht sich auf den Zeitraum ab dem Beginn der Lovastatininkubation. Normalisiert wurden die Ergebnisse auf die jeweilige Kontrolle ($\cong 100\%$). Für jede Bedingung wurde der Mittelwert aus 6 Replikaten gebildet. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten.

Die Dosis-Wirkungsbeziehung einer 4-stündigen Vorbehandlung mit EHT 1864 wird in Abb. 8 abgebildet. Dargestellt ist die Viabilität in Abhängigkeit von der EHT 1864-Dosis. Die Viabilitätsmessung erfolgte 24 h, 48 h, sowie 72 h nach dem Ende der Vorbehandlung. Es zeigte sich ab einer Konzentration von 25 μM EHT 1864 ein moderat zytotoxischer Effekt. Dieser nahm durch eine weitere Dosissteigerung nicht deutlich zu. Damit stellte sich die Konzentration von 25 μM EHT als geeignet für die anschließenden Versuche dar.

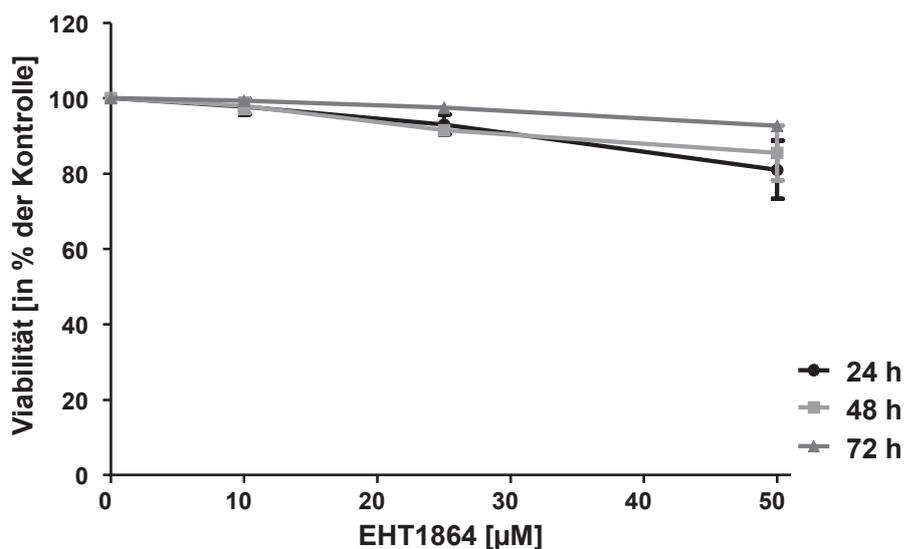


Abb. 8 Bestimmung des zytotoxischen Effekts von einer Vorbehandlung mit EHT 1864 auf die HaCaT-Zellen. Die Inkubation mit EHT 1864 erfolgte 24 h nach dem Aussäen der HaCaT-Zellen für ein Intervall von 4 h. Der Messzeitpunkt (24 – 72 h) bezieht sich auf den Zeitraum nach der Behandlung. Normalisiert wurden die Ergebnisse auf die jeweilige Kontrolle ($\cong 100\%$). Für jede Bedingung wurde der Mittelwert aus 6 Replikaten gebildet. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten.

Die Dosis-Wirkungsbeziehung einer EHT-Dauerbehandlung wird in Abb. 9 gezeigt. Dargestellt ist die Viabilität in Abhängigkeit von der EHT-Dosis. Die Viabilitätsmessung erfolgte 24 h, 48 h, sowie 72 h nach dem Ende der Pulsbehandlung. Die Dosis-Wirkungsbeziehung der EHT-Dauerbehandlung unterlag einem linearen Zusammenhang, wobei der Grad der Zytotoxizität dabei unabhängig von der Behandlungsdauer war.

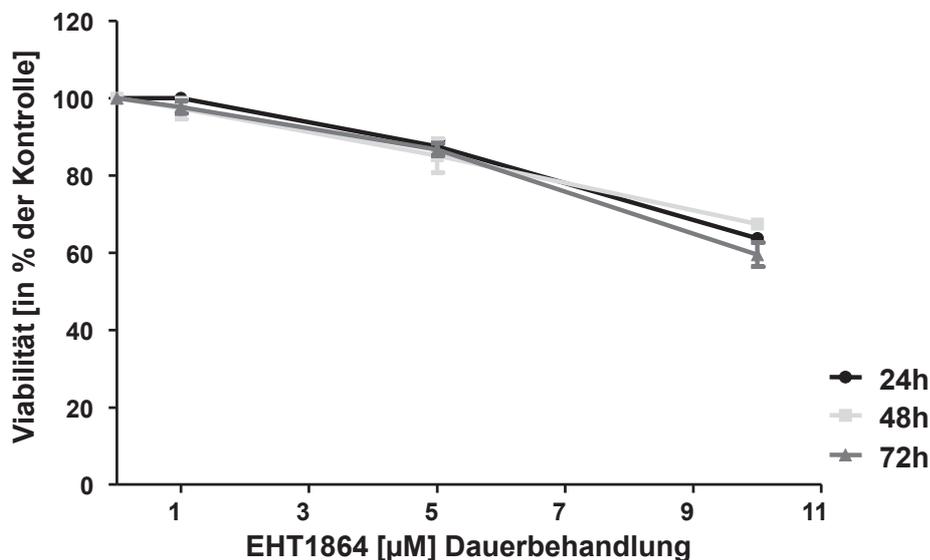
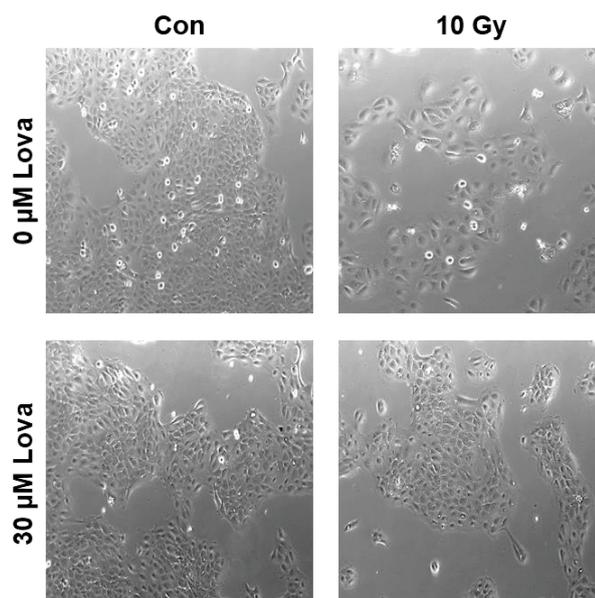


Abb. 9 Bestimmung des zytotoxischen Effekts von einer Dauerbehandlung mit EHT 1864 auf die HaCaT-Zellen. Die Dauerbehandlung begann 24 h nach dem Aussäen der HaCaT-Zellen. Jeweils nach 24 h wurde ein Mediumwechsel unter Zugabe von neuem EHT 1864 durchgeführt. Der Messzeitpunkt (24 – 72 h) bezieht sich auf den Zeitraum ab dem Beginn der Behandlung. Normalisiert wurden die Ergebnisse auf die jeweilige Kontrolle ($\cong 100\%$). Für jede Bedingung wurde der Mittelwert aus 6 Replikaten gebildet. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten.

4.1.2 Lovastatin reduziert die strahlungsinduzierte Viabilitätsabnahme signifikant

Um den zytoprotektiven Effekt von Lovastatin gegenüber der Einwirkung ionisierender Strahlung nachzuweisen, wurde zunächst untersucht, ob eine transiente Vorbehandlung (30 μM) oder Dauerbehandlung (10 μM) mit Lovastatin die strahlungsinduzierte Viabilitätsabnahme reduziert. Einen Tag bevor die Zellen für 24 h mit 30 μM Lovastatin präinkubiert wurden, erfolgte das Aussäen. Im Anschluss an das Präinkubationsintervall wurde mit Strahlendosen von 3 Gy, 10 Gy und 30 Gy bestrahlt. An die Bestrahlung schloss sich ein erneuter Mediumwechsel an, bevor die Zellen bis zu den Messzeitpunkten nach 24 h, 48 h und 72 h bei wiederum täglichem Wechsel des Mediums inkubiert wurden. Zusätzlich zu der Vorbehandlung mit 30 μM Lovastatin erfolgte eine Dauerbehandlung mit 10 μM Lovastatin. Dazu wurde täglich frisches, mit Lovastatin versetztes Medium appliziert. Als Kontrollen dienten unbehandelte und lediglich mit den Modulatoren inkubierte Zellen. Bei der Ergebnisauswertung wurde zur besseren Vergleichbarkeit der vorbehandelten und nicht-vorbehandelten Zellen für die Normierung die jeweilige Kontrolle herangezogen.

Neben der Untersuchung der Viabilität wurden die Zellen täglich lichtmikroskopisch hinsichtlich ihrer Morphologie und der Zelldichte beurteilt (Abb. 10). Dabei konnte deutlich beobachtet werden, dass die bestrahlten Zellen, die mit Lovastatin vorbehandelt wurden, ähnlich proliferierten wie die unbehandelte Kontrolle. Gleichzeitig war die Proliferation der bestrahlten, nicht mit Lovastatin vorbehandelten Zellen reduziert.



Ergebnisse

Abb. 10 Lichtmikroskopische Bilder der bestrahlten und nicht-bestrahlten HaCaT-Zellen mit optionaler Lovastatinvorbehandlung. Die HaCaT-Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen optional mit 30 μ M Lovastatin vorbehandelt und nach 24-stündiger Inkubation bestrahlt. Die lichtmikroskopischen Bilder wurden 48 h nach der Bestrahlung mit einem 10 x Objektiv aufgenommen.

In Abb. 11 wird die Modulation der strahlungsinduzierten Zytotoxizität durch eine Vorbehandlung mit Lovastatin dargestellt. Die Vorbehandlung mit Lovastatin reduzierte bei einer Strahlendosis von 10 Gy und 30 Gy die Viabilitätsabnahme signifikant nach einer Inkubationszeit von 48 h nach Ende der transienten Lovastatinvorbehandlung. Nach weiteren 24 h war der Effekt nur für eine Strahlendosis von 10 Gy signifikant, wobei auch für 30 Gy der Trend einer Abnahme der Viabilitätsreduktion beobachtet werden konnte.

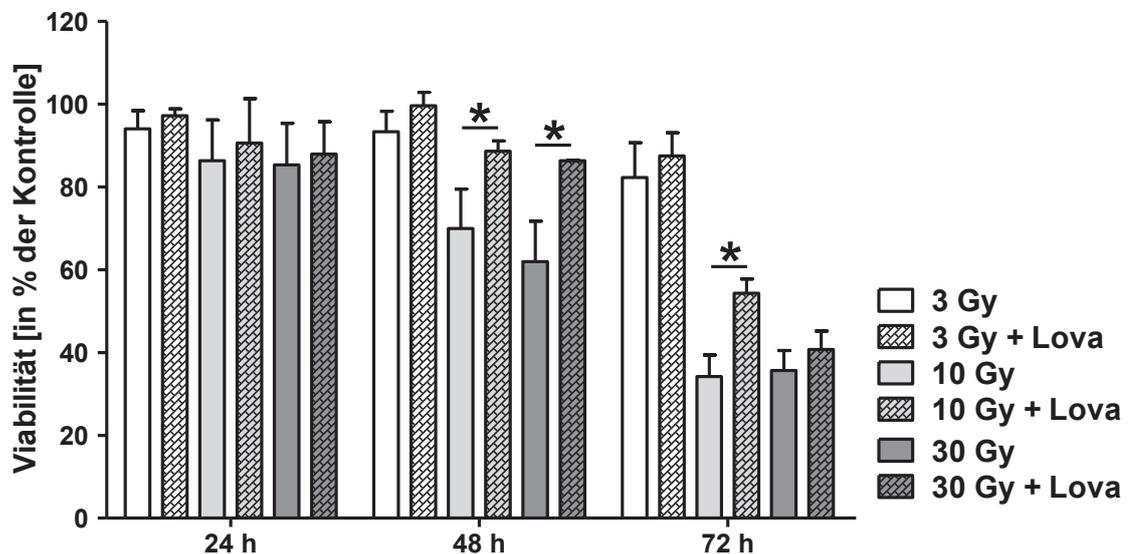


Abb. 11 Modulation der strahlungsinduzierten Zytotoxizität durch eine Vorbehandlung mit Lovastatin. Die HaCaT-Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen mit 30 μ M Lovastatin vorbehandelt und nach 24-stündiger Inkubation bestrahlt. Die Messzeitpunkte (24 – 72 h) entsprechen den Zeiträumen nach der Bestrahlung. Normalisiert wurden die Ergebnisse auf die jeweilige Kontrolle (\cong 100 %). Für jede Bedingung wurde der Mittelwert aus 6 Replikaten gebildet. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten. Student's t-test: * \cong $p < 0,05$, Lova-behandelte, bestrahlte Zellen im Vergleich zu bestrahlten Zellen.

Gegenüber dem lichtmikroskopischen Bild der für 24 h mit 30 μ M Lovastatin vorbehandelten Zellen schien der mögliche protektive Effekt einer Lovastatin-Dauerbehandlung mit 10 μ M gegenüber ionisierender Bestrahlung geringer auszufallen (Abb. 12).

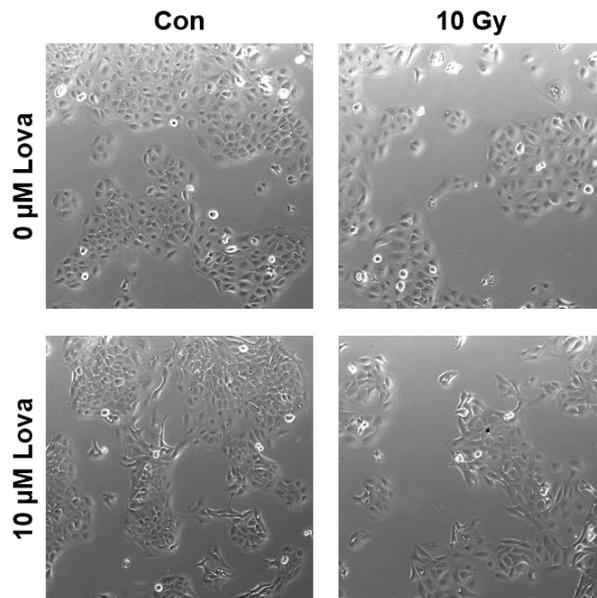


Abb. 12 Lichtmikroskopische Bilder der bestrahlten und nicht-bestrahlten HaCaT-Zellen mit optionaler Lovastatindauerbehandlung. Die Dauerbehandlung mit 10 µM Lovastatin wurde 24 h nach dem Aussäen der HaCaT-Zellen begonnen. Weitere 24 h später folgte die Bestrahlung. Ein Mediumwechsel, um die Lovastatinkonzentration konstant zu halten, erfolgte täglich. Die lichtmikroskopischen Bilder wurden 48 h nach der Bestrahlung mit einem 10 x Objektiv aufgenommen.

Abb. 13 beschreibt die Modulation der strahlungsinduzierten Zytotoxizität durch eine Dauerbehandlung mit Lovastatin. Die Dauerbehandlung begann ebenso wie die transiente Vorbehandlung 24 h vor der Bestrahlung, wurde dann jedoch nach der Bestrahlung fortgesetzt. Anders als bei der transienten Vorbehandlung mit Lovastatin fiel der zytoprotektive Effekt deutlich geringer aus. Zwar war sowohl 48 h, als auch 72 h nach der Bestrahlung tendenziell eine höhere Viabilität der ko-behandelten Zellen erkennbar, signifikant bildete sich dieser Effekt aber lediglich 72 h nach der Applikation einer Strahlendosis von 10 Gy aus.

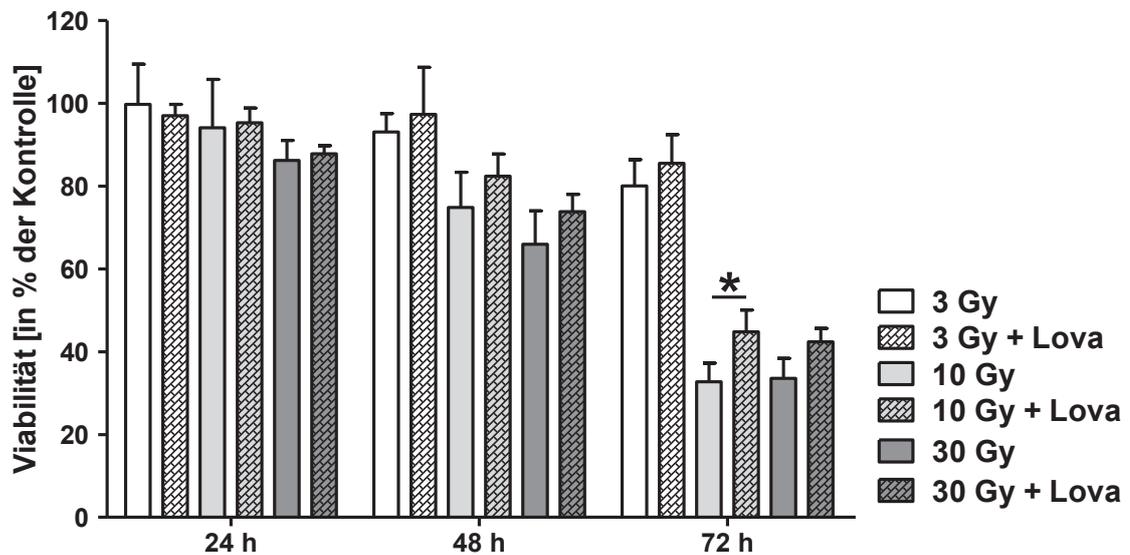


Abb. 13 Modulation der strahlungsinduzierten Zytotoxizität durch eine Dauerbehandlung mit Lovastatin. Die Dauerbehandlung mit 10 μM Lovastatin wurde 24 h nach dem Aussäen der HaCaT-Zellen begonnen, weitere 24 h später erfolgte die Bestrahlung. Ein Mediumwechsel, um die Lovastatinkonzentration konstant zu halten, erfolgte täglich. Die Messzeitpunkte (24 – 72 h) entsprechen den Zeiträumen nach der Bestrahlung. Normalisiert wurden die Ergebnisse auf die jeweilige Kontrolle ($\triangleq 100\%$). Für jede Bedingung wurde der Mittelwert aus 6 Replikaten gebildet. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten. Student's t-test: * $\triangleq p < 0,05$, Lova-behandelte, bestrahlte Zellen im Vergleich zu bestrahlten Zellen.

Zusammenfassend ist auf Grundlage der Ergebnisse der Viabilitätsuntersuchungen festzustellen, dass Lovastatin bei der Dauerbehandlung mit 10 μM und insbesondere bei der transienten Vorbehandlung mit 30 μM möglicherweise zytoprotektiv auf die bestrahlten HaCaT-Keratinocyten wirkt. Dabei fiel die Abnahme der Viabilitätsreduktion der bestrahlten Zellen durch die transiente Vorbehandlung mit 30 μM Lovastatin deutlicher aus als bei der Dauerbehandlung mit 10 μM Lovastatin. Als mögliche Ursache kommen neben der geringeren Lovastatindosis vor der Bestrahlung auch antiproliferative Effekte durch die Dauerbehandlung selbst in Betracht.

4.1.3 Lovastatin reduziert die Doxorubicin-induzierte Viabilitätsabnahme signifikant

Um den zytoprotektiven Effekt von Lovastatin gegenüber der Behandlung mit Doxorubicin zu bestimmen, wurde zunächst die Abnahme der Viabilitätsreduktion durch eine transiente Vorbehandlung (30 μM) bzw. eine Dauerbehandlung (10 μM) untersucht. Dabei wurde die Dauerbehandlung ebenso wie die transiente Vorbehandlung 24 h vor der Doxorubicinbehandlung begonnen und dann im Anschluss an diese fortgesetzt. Das Aussäen und die Behandlung der Zellen erfolgte analog zu den Experimenten mit ionisierender Strahlung: Die Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen für 24 h mit Lovastatin inkubiert und im Anschluss für 2 h mit Doxorubicin behandelt. Bei der Ergebnisauswertung wurde zur besseren Vergleichbarkeit der vorbehandelten und nicht-vorbehandelten Zellen die jeweilige Kontrolle für die Normierung herangezogen.

Bei der lichtmikroskopischen Beobachtung der Zellen fiel 48 h nach der Doxorubicinbehandlung eine deutliche Reduktion der Zellzahl gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf. Dieser Effekt von Doxorubicin wurde durch die transiente Vorbehandlung mit 30 μM Lovastatin mäßiggradig reduziert (Abb.14).

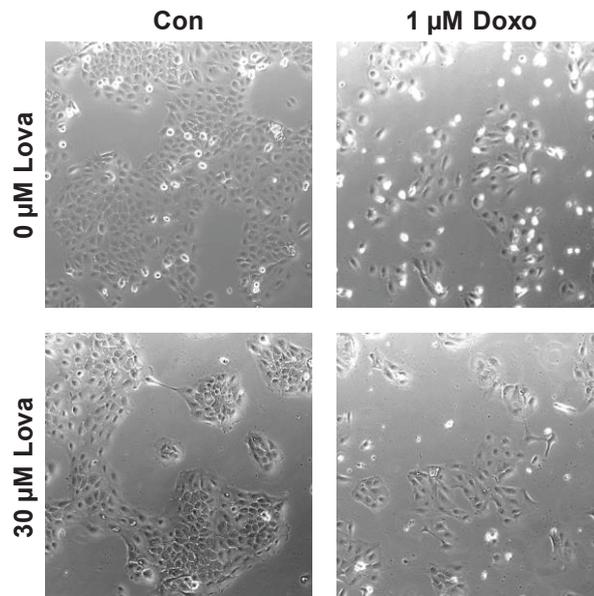


Abb. 14 Lichtmikroskopische Bilder der Doxorubicin-behandelten und nicht-behandelten HaCaT-Zellen mit optionaler Lovastatinvorbehandlung. Die HaCaT-Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen mit 30 µM Lovastatin vorbehandelt und nach einem Intervall von 24 Stunden für 2 h mit Doxorubicin inkubiert. Die lichtmikroskopischen Bilder wurden 48 h nach der Pulsbehandlung mit Doxorubicin mit einem 10 x Objektiv aufgenommen.

Die Wirkung der transienten Vorbehandlung mit 30 µM Lovastatin auf das zytotoxische Potential von Doxorubicin beschreibt Abb. 15. Insbesondere nach 48 h konnte eine signifikant reduzierte Viabilitätsabnahme durch Lovastatin bei allen Doxorubicinkonzentrationen gezeigt werden. Insofern spiegelte sich die lichtmikroskopisch beobachtete geringere Abnahme der Zelldichte durch eine Lovastatinvorbehandlung vor der Inkubation mit Doxorubicin in den Ergebnissen des Resazurin-Reduktionstests wider. Der Trend einer reduzierten Viabilitätsabnahme durch die transiente Lovastatinvorbehandlung zeigte sich auch bei dem dritten Messzeitpunkt 72 h nach der Behandlung insbesondere bei einer Doxorubicinkonzentration von 1 µM.

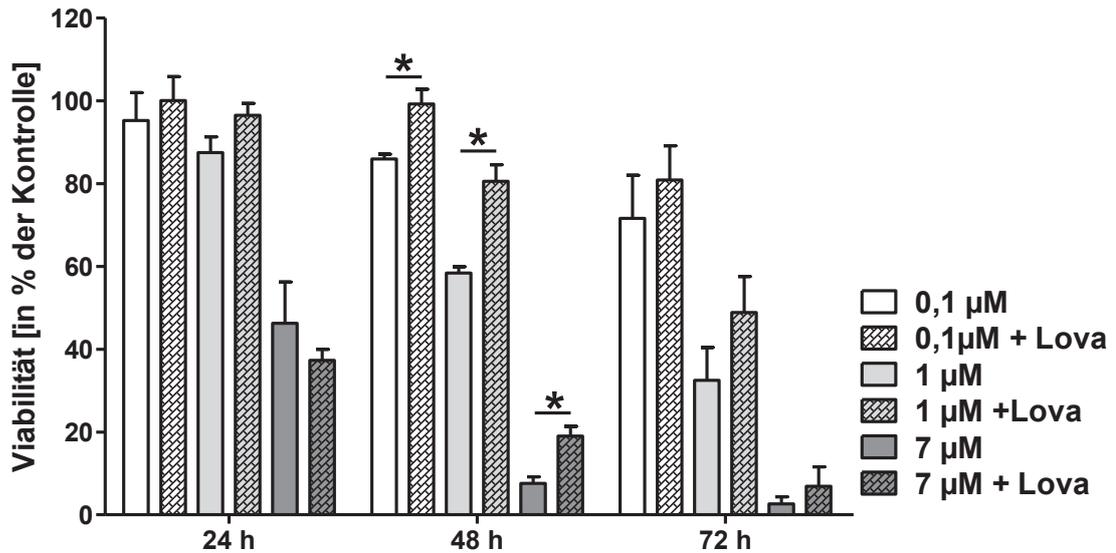


Abb. 15 Modulation der Doxorubicin-induzierten Zytotoxizität durch eine Vorbehandlung mit Lovastatin. Die HaCaT-Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen mit 30 μM Lovastatin vorbehandelt und nach einem 24-stündigen Intervall für 2 h mit verschiedenen Konzentrationen Doxorubicin (0,1 – 7 μM) inkubiert. Die Messzeitpunkte (24 – 72 h) entsprechen den Zeiträumen nach der Doxorubicinbehandlung. Normalisiert wurden die Ergebnisse auf die jeweilige Kontrolle ($\cong 100\%$). Für jede Bedingung wurde der Mittelwert aus 6 Replikaten gebildet. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten. Student's t-test: * $\cong p < 0,05$, Lova- und Doxo-behandelte Zellen im Vergleich zu Doxo-behandelten Zellen.

Bei der lichtmikroskopischen Analyse der Anzahl und Morphologie der Zellen, die mit 10 μM Lovastatin über den gesamten Beobachtungszeitraum behandelt und für 2 h mit Doxorubicin inkubiert wurden, konnte kein wesentlicher Unterschied gegenüber den lediglich Doxorubicin-behandelten Zellen festgestellt werden (Abb. 16). Die Lovastatin-dauerbehandlung schien keinen protektiven Effekt gegenüber der zytotoxischen Doxorubicinwirkung zu haben. Darüber hinaus wurde die Zelldichte auch durch die alleinige Behandlung mit Lovastatin gegenüber der unbehandelten Kontrolle reduziert und es war deutlich die veränderte Morphologie (astartige Zellausläufer) durch die Lovastatindauerbehandlung zu erkennen.

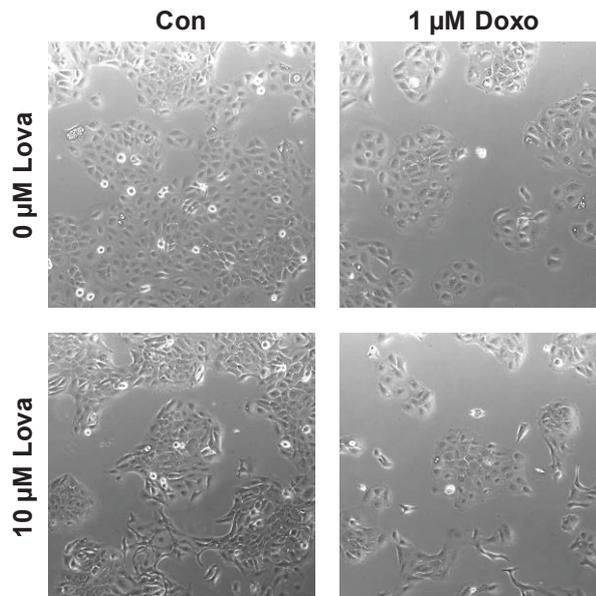


Abb. 16 Lichtmikroskopische Bilder der Doxorubicin-behandelten und nicht-behandelten HaCaT-Zellen mit optionaler Lovastatindauerbehandlung. Die Dauerbehandlung mit 10 µM Lovastatin wurde 24 h nach dem Aussäen begonnen. Weitere 24 h später folgte die zweistündige Inkubation mit Doxorubicin. Ein Mediumwechsel, um die Lovastatinkonzentration konstant zu halten, erfolgte täglich. Die lichtmikroskopischen Bilder wurden 48 h nach der Pulsbehandlung mit Doxorubicin mit einem 10 x Objektiv aufgenommen.

Abb. 17 stellt den Einfluss einer Lovastatindauerbehandlung auf den zytotoxischen Effekt von Doxorubicin dar. Der protektive Effekt von Lovastatin war bei einer dauerhaften Behandlung der Zellen mit 10 µM Lovastatin nicht signifikant nachweisbar. Jedoch konnte 72 h nach dem Ende der Behandlung mit Doxorubicin eine leichte Reduktion der Viabilitätsabnahme durch die Lovastatinbehandlung beobachtet werden.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass analog zu den Experimenten mit ionisierender Strahlung die Dauerbehandlung mit Lovastatin der transienten Lovastatinvorbehandlung hinsichtlich einer Reduktion der Doxorubicin-induzierten Viabilitätsabnahme unterlegen ist. Als Erklärungsansätze sind neben einer zu geringen Lovastatindosis in den 24 h vor der Behandlung mit Doxorubicin eine potentiell zytotoxische Wirkung durch die Lovastatinwirkung zu nennen. An dieser Stelle ist auf die veränderte Morphologie der Zellen und die geringere Zelldichte durch die Lovastatinbehandlung in der Lichtmikroskopie zu verweisen, die im Rahmen der Dauerbehandlung deutlicher ausgeprägt waren als bei der transienten Vorbehandlung. Möglicherweise wirkt Lovastatin arretierend auf den Zellzyklus, was die beobachteten Zellveränderungen durchaus erklären könnte.

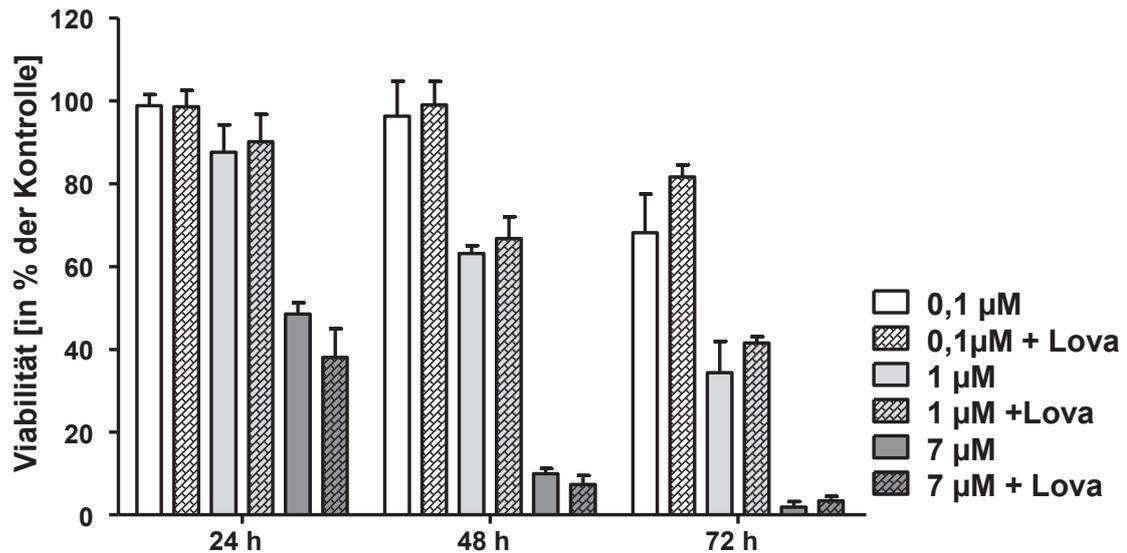


Abb. 17 Modulation der Doxorubicin-induzierten Zytotoxizität durch eine Dauerbehandlung mit Lovastatin. Die Dauerbehandlung mit 10 µM Lovastatin wurde 24 h nach dem Aussäen der HaCaT-Zellen begonnen. Weitere 24 h später folgte die zweistündige Inkubation mit Doxorubicin. Die Messzeitpunkte (24 – 72 h) entsprechen den Zeiträumen nach der Inkubation mit Doxorubicin. Ein Mediumwechsel, um die Lovastatinkonzentration konstant zu halten, erfolgte täglich. Normalisiert wurden die Ergebnisse auf die jeweilige Kontrolle ($\cong 100\%$). Für jede Bedingung wurde der Mittelwert aus 6 Replikaten gebildet. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten.

Abschließend ist unter Berücksichtigung sämtlicher Ergebnisse der Viabilitätsuntersuchungen mit dem Resazurin-Reduktionstest festzustellen, dass insbesondere durch die transiente Vorbehandlung mit 30 µM Lovastatin eine Reduktion der Viabilitätsabnahme erfolgte und damit ein potentiell zytoprotektiver Effekt abgebildet wird. In wie weit es sich tatsächlich um eine Protektion handelt und nicht etwa um eine reine Zellzyklusarretierung wurde mit Hilfe durchflusszytometrischer Zellzyklusanalysen untersucht.

4.2 Durchflusszytometrische Analyse des Zellzyklus und der SubG1-Fraktion

Zur vergleichenden Bestimmung der Zellzyklusverteilung der Lovastatin vorbehandelten, nicht-vorbehandelten und jeweils optional bestrahlten oder mit Doxorubicin-inkubierten Zellpopulationen wurde der Zellzyklus mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht.

Von besonderem Interesse war dabei die SubG1-Fraktion, die sämtliche Zellen einer Population umfasst, die weniger als den doppelten Chromosomensatz enthalten. Dabei kann es sich sowohl um apoptotische, als auch um nekrotische Zellen handeln. Die

Ergebnisse

Experimente wurden mit der Zielsetzung durchgeführt, mögliche Mechanismen der protektiven Lovastatineffekte aufzudecken, die im Rahmen der Viabilitätsmessungen gezeigt werden konnten. Gleichzeitig wurde untersucht, ob den zytotoxischen Wirkungen der verwendeten Agenzien und der Bestrahlung der Zellen ein Zellzyklusarrest zu Grunde lag. Es war jedoch zu beachten, dass durch die Durchflusszytometrie keine sichere Quantifizierung der S-Phase möglich ist. Für eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit denen des Resazurin-Reduktionstests erfolgte die Behandlung der Zellen mit dem gleichen Protokoll. Die durchflusszytometrische Analyse wurde an den beiden frühen Messzeitpunkten nach 24 h und 48 h durchgeführt.

Zunächst wurde der Einfluss einer Behandlung mit Lovastatin und EHT 1864 auf die Induktion der SubG1-Fraktion untersucht (Abb. 18). Für die Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse wurde der Anteil der Zellen in der SubG1-Fraktion der unbehandelten Kontrolle als 0 % definiert. Es zeigte sich, dass beide Anwendungsformen von Lovastatin zur Induktion der SubG1-Fraktion führten. Während der Anteil durch die Dauerbehandlung mit 10 μ M Lovastatin stetig zunahm, kam es in Folge der 24-stündigen Lovastatinbehandlung zu einer Abnahme des Anteils der Zellpopulation in der SubG1-Fraktion zwischen den beiden Messzeitpunkten der Durchflusszytometrie.

Im Gegensatz zu Lovastatin erhöhte EHT 1864 den Anteil der Zellpopulation in der SubG1-Fraktion nicht über 0,3 %. Aus diesem Grund wurden die Daten nicht graphisch aufgetragen.

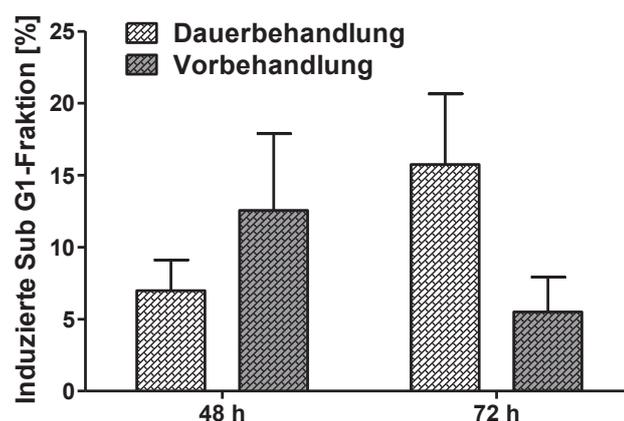


Abb. 18 Lovastatin erhöht den Anteil der HaCaT-Zellpopulation an der SubG1-Fraktion. 24 h nach dem Aussäen der HaCaT-Zellen wurde optional eine 24-stündige Behandlung mit 30 μ M Lovastatin oder eine dauerhafte Behandlung mit 10 μ M Lovastatin begonnen. Es wurde täglich das Medium bzw. das Lovastatin-versetzte Medium gewechselt. Der Messzeitpunkt (48 h, 72 h) bezieht sich auf das Ende der 24-stündigen Lovastatinbehandlung. Normalisiert wurden die Ergebnisse auf eine unbehandelte Kontrolle (\pm 0 %). Dargestellt ist der normalisierte Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten (ein Replikat pro Bedingung).

4.2.1 Lovastatin reduziert die strahlungsbedingte Induktion der SubG1-Fraktion signifikant

Nachdem bereits die Untersuchung der Zellviabilität deutliche Hinweise auf den zytoprotektiven Effekt einer Vorbehandlung mit Lovastatin lieferte, sollte mittels der Quantifizierung der SubG1-Fraktion verifiziert werden, in wie weit die Inhibition von Apoptose und Nekrose diese Effekte bedingen.

Abb. 19 stellt die Induktion der SubG1-Fraktion durch ionisierende Strahlung und die Modulation durch eine transiente Vorbehandlung mit Lovastatin dar. Es konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung mit Lovastatin insbesondere 48 h nach der Bestrahlung den Anteil der Zellen in der SubG1-Fraktion signifikant reduzierte. Besonders deutlich war der Effekt bei einer Strahlendosis von 10 Gy. Der Anteil der Zellpopulation in der SubG1-Fraktion nach der Bestrahlung mit 10 Gy wurde durch die Vorbehandlung mit Lovastatin halbiert. Nach 72 h war weiterhin der Trend einer protektiven Wirkung des Modulators nachweisbar.

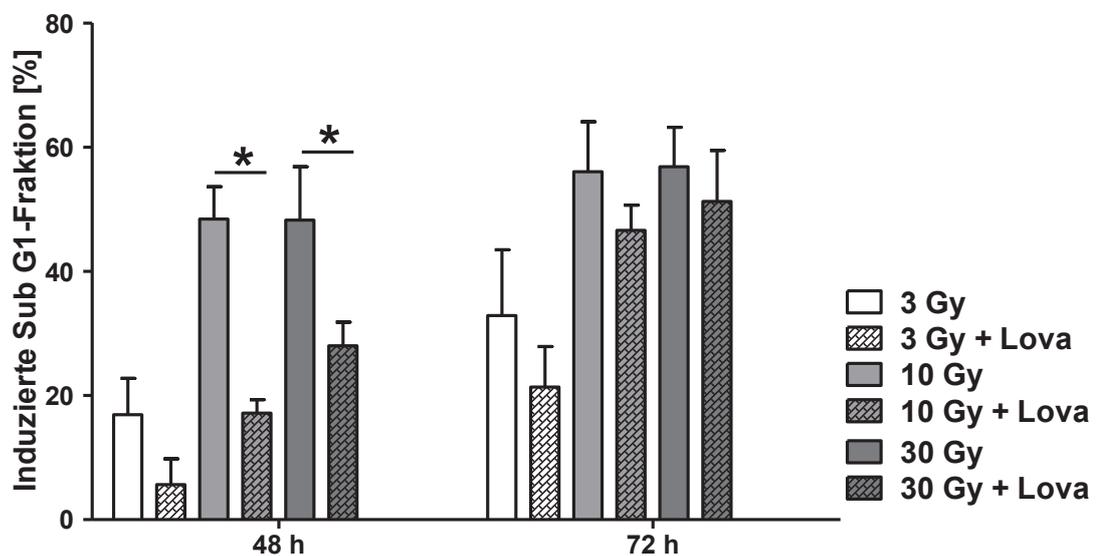


Abb. 19 Modulation der strahlungsinduzierten SubG1-Fraktion durch eine Vorbehandlung mit Lovastatin. Die HaCaT-Zellen wurden optional für 24 h mit 30 μ M Lovastatin vorbehandelt und anschließend bestrahlt. Die Behandlung wurde analog zum Resazurin-Reduktionstest durchgeführt. Die Aufarbeitung und die durchflusszytometrische Untersuchung erfolgten 48 h und 72 h nach der Bestrahlung. Normalisiert wurden die Ergebnisse auf eine vorbehandelte bzw. nicht-vorbehandelte Kontrolle (\cong 0 %). Dargestellt ist der normalisierte Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten (ein Replikat pro Bedingung).

Student's t-test: * \cong p < 0,05, Lova-behandelte, bestrahlte Zellen im Vergleich zu bestrahlten Zellen.

Ergebnisse

Auch eine Dauerbehandlung mit 10 μM Lovastatin bedingte eine Reduktion des Anteils der Zellpopulation an der SubG1-Fraktion (Abb. 20). Der Effekt war jedoch ebenso wie der auf die strahlungsinduzierte Viabilitätsreduktion geringer ausgeprägt als durch die transiente Vorbehandlung mit 30 μM Lovastatin. Eine signifikante Wirkung der Lovastatindauerbehandlung war lediglich nach einer Bestrahlung mit 30 Gy am Messzeitpunkt 48 h feststellbar.

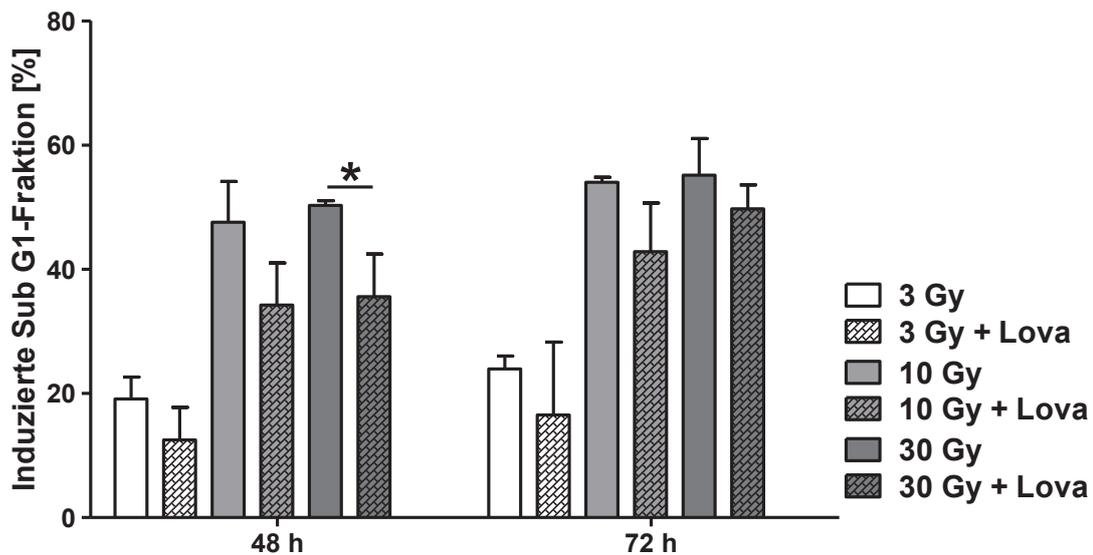


Abb. 20 Modulation der strahlungsinduzierten SubG1-Fraktion durch eine Dauerbehandlung mit Lovastatin. 24 h nach dem Aussäen wurde optional eine Dauerbehandlung der HaCaT-Zellen mit 10 μM Lovastatin begonnen, bevor nach weiteren 24 h die Bestrahlung erfolgte. Die Behandlung wurde analog zum Resazurin-Reduktionstest durchgeführt. Die Aufarbeitung und durchflusszytometrische Untersuchung erfolgten 48 h und 72 h nach der Bestrahlung. Normalisiert wurden die Ergebnisse auf eine vorbehandelte bzw. nicht-vorbehandelte Kontrolle ($\cong 0\%$). Dargestellt ist der normalisierte Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten (ein Replikat pro Bedingung). Student's t-test: * $\cong p < 0,05$, Lova-behandelte, bestrahlte Zellen im Vergleich zu bestrahlten Zellen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass insbesondere durch Strahlendosen oberhalb von 3 Gy ein Großteil der Zellpopulation nicht mehr den doppelten Chromosomensatz aufweist und damit apoptotisch oder nekrotisch ist oder aber in der S-Phase arretiert wurde. Insbesondere 48 h nach dem Behandlungsende wirkte eine Lovastatinvorbehandlung zytoprotektiv und reduzierte die SubG1-Fraktion nach der Bestrahlung. Es bleibt zu untersuchen, welche Mechanismen diesen zytoprotektiven Effekt bedingen. Denkbar ist zum einen ein Zellzyklusarrest, zum anderen aber auch eine verbesserte DNA-Schadenantwort.

4.2.2 Lovastatin reduziert den strahlungs-induzierten Zellzyklusblock in der G₂-Phase

Neben der Bestimmung der SubG1-Fraktion kann mit Hilfe der Durchflusszytometrie die Zellzyklusverteilung untersucht werden. Dabei ist zu beachten, dass aufgrund von Überschneidungen mit der G₁- und der G₂-Phase eine sichere Bestimmung der S-Phase nicht möglich ist. Um im Rahmen der Auswertung der durchflusszytometrischen Analyse den Anteil der Zellpopulation in der S-Phase näherungsweise bestimmen zu können, wurde zunächst die Summe der Zellpopulationsanteile in der G₁- und G₂-Phase gebildet und anschließend von 100 % subtrahiert. ($S = 100 \% - (G_1 + G_2)$)

In Abb. 22 ist die Wirkung von ionisierender Strahlung auf die Zellzyklusverteilung und die Modulation durch eine Vorbehandlung mit Lovastatin aufgetragen, während Abb. 21 exemplarische Bilder der Durchflusszytometrie zeigt. Zunächst ist festzustellen, dass eine 24-stündige Behandlung mit Lovastatin eine signifikante Verschiebung des Zellzyklus mit Zunahme des Zellpopulationsanteils in der G₂-Phase bei gleichzeitiger Abnahme in der G₁-Phase bedingte. Die Bestrahlung der Zellpopulation führte abhängig von der applizierten Strahlendosis zur Induktion eines Zellzyklusblocks in der G₂-Phase. Dabei nahm der G₂-Block mit steigender Strahlendosis zu und war bei 30 Gy am deutlichsten ausgeprägt (Pfeile in Abb. 21). Die transiente Vorbehandlung der bestrahlten Zellen mit 30 µM Lovastatin führte zu einer signifikanten Reduktion des G₂-Block, der durch eine Strahlendosis von 30 Gy induziert worden war. Dieses Ergebnis ist insofern interessant, als das Lovastatin wie bereits ausgeführt selbst zu einer Zunahme der G₂-Fraktion führte.

Wie Abb. 24 zu entnehmen ist, hatte die Dauerbehandlung mit 10 µM Lovastatin keine Wirkung auf die Zellzyklusverteilung. Die aufhebende Wirkung auf den strahlungsinduzierten G₂-Block (Pfeile in Abb. 23), die schon für die Lovastatinvorbehandlung gezeigt werden konnte, war auch im Rahmen der Lovastatindauerbehandlung signifikant. Insgesamt fiel dieser Effekt jedoch geringer aus als bei der Vorbehandlung.

Die These, dass die zytoprotektiven Lovastatineffekte durch eine Zellzyklusregulation bedingt sind, ist somit auf Basis dieser Experimente zu bestätigen. Neben einer Reduktion der SubG1-Fraktion bewirkte Lovastatin eine Abnahme des strahlungsinduzierten Zellzyklusblocks in der G₂-Phase. Zu überprüfen bleibt, inwiefern ein Zellzyklusblock die zytoprotektiven Effekte von Lovastatin bedingte oder ob es zu einer verbesserten DNA-Schadenantwort kam.

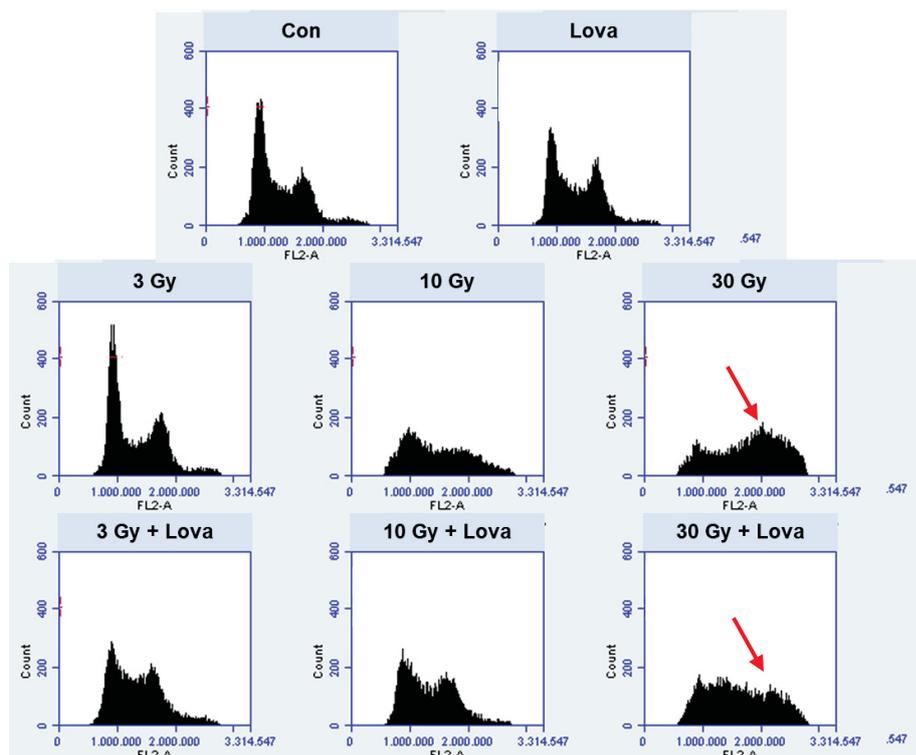


Abb. 21 Exemplarische Bilder der Durchflusszytometrie nach einer Vorbehandlung bestrahlter HaCaT-Zellen mit Lovastatin. Die HaCaT-Zellen wurden optional für 24 h mit 30 μ M Lovastatin vorbehandelt und anschließend bestrahlt. Die Behandlung wurde analog zum Resazurin-Reduktionstest durchgeführt. Aufarbeitung und durchflusszytometrische Untersuchung erfolgten 48 h nach der Bestrahlung. Die roten Pfeile markieren die G₂-Fraktion.

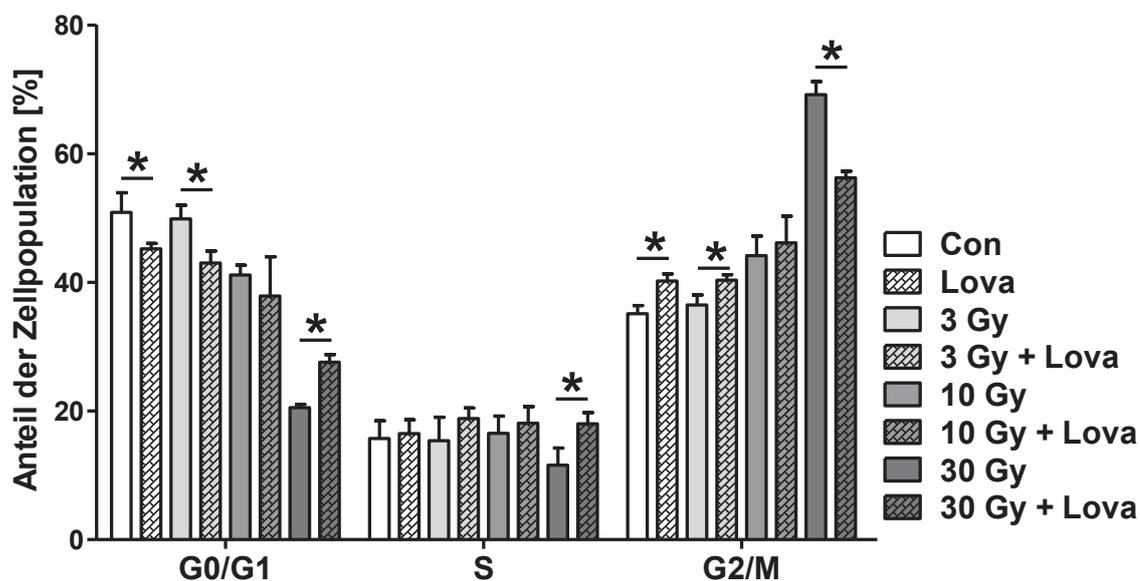


Abb. 22 Modulation der strahlungsinduzierten Effekte auf den Zellzyklus durch eine Vorbehandlung mit Lovastatin. Die HaCaT-Zellen wurden optional für 24 h mit 30 μ M Lovastatin vorbehandelt und anschließend bestrahlt. Die Behandlung wurde analog zum Resazurin-Reduktionstest durchgeführt. Die Aufarbeitung und die durchflusszytometrische Untersuchung erfolgten 48 h nach der Bestrahlung. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten (ein Replikat je Bedingung). Student's t-test: * \triangleq $p < 0,05$, Lova-behandelte, bestrahlte Zellen im Vergleich zu bestrahlten Zellen.

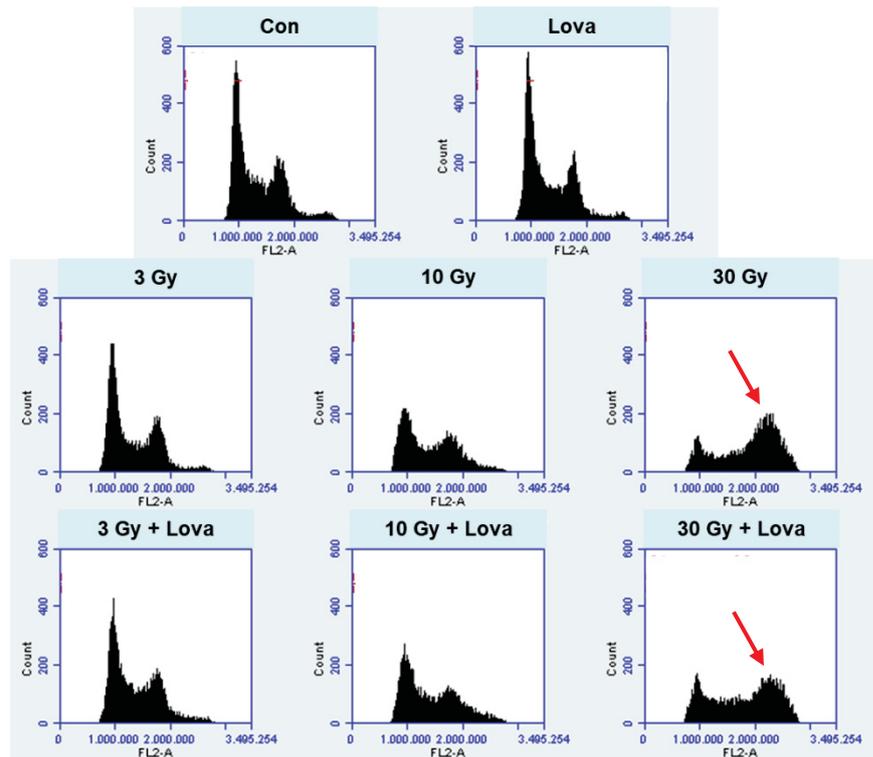


Abb. 23 Exemplarische Bilder der Durchflusszytometrie nach einer Dauerbehandlung bestrahlter HaCaT-Zellen mit Lovastatin. Die HaCaT-Zellen wurden optional mit 10 μM Lovastatin dauerbehandelt und bestrahlt. Die Behandlung wurde analog zum Resazurin-Reduktionstest durchgeführt und durchflusszytometrische Untersuchung erfolgte 48 h nach der Bestrahlung. Die roten Pfeile markieren die G_2 -Fraktion.

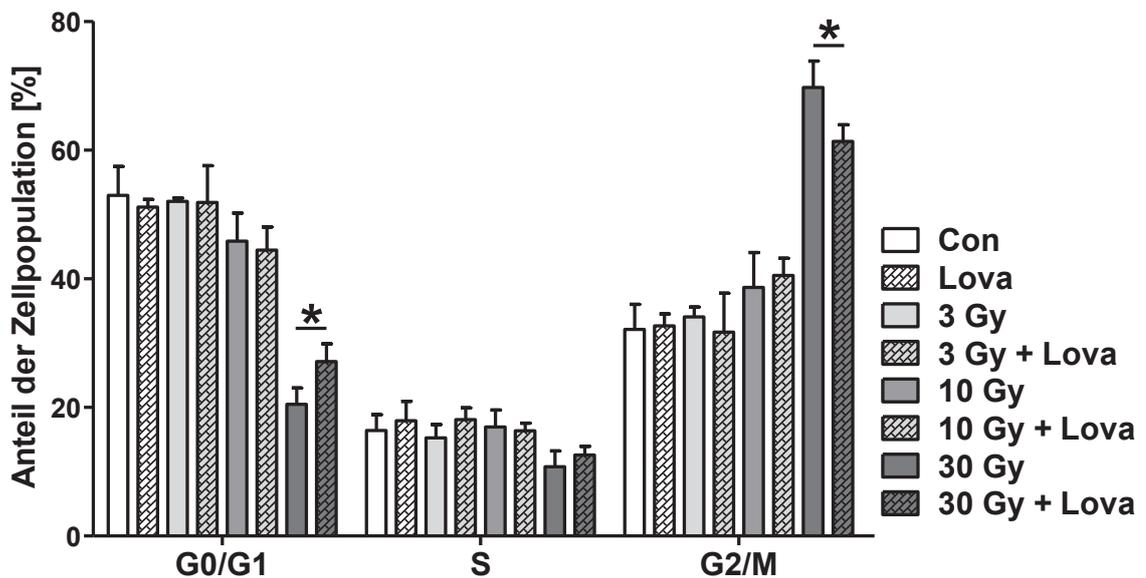


Abb. 24 Modulation der strahlungsinduzierten Effekte auf den Zellzyklus durch eine Dauerbehandlung mit Lovastatin. Die HaCaT-Zellen wurden optional mit 10 μM Lovastatin dauerbehandelt und bestrahlt. Die Behandlung wurde analog zum Resazurin-Reduktionstest durchgeführt. Die Aufarbeitung und die durchflusszytometrische Untersuchung erfolgten 48 h nach der Bestrahlung. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten (ein Replikat je Bedingung). Student's t-test: * $\triangleq p < 0,05$, Lova-behandelte, bestrahlte Zellen im Vergleich zu bestrahlten Zellen.

4.2.3 Lovastatin reduziert die Doxorubicin-bedingte Induktion der SubG1-Fraktion

Im Rahmen des Resazurin-Reduktionstests konnte die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin durch eine Behandlung mit Lovastatin herabgesetzt werden. Korrelierend zu diesem Ergebnis reduzierte Lovastatin den Anteil der Zellpopulation in der SubG1-Fraktion nach einer Behandlung mit Doxorubicin.

In Abb. 25 ist die Induktion der SubG1-Fraktion durch Doxorubicin und die Modulation dieser durch eine transiente Vorbehandlung mit 30 μM Lovastatin dargestellt. Sowohl nach 48 h, als auch nach 72 h war eine signifikante Abnahme des Anteils der Zellpopulation in der SubG1-Fraktion unabhängig von der verwendeten Doxorubicinkonzentration nachweisbar.

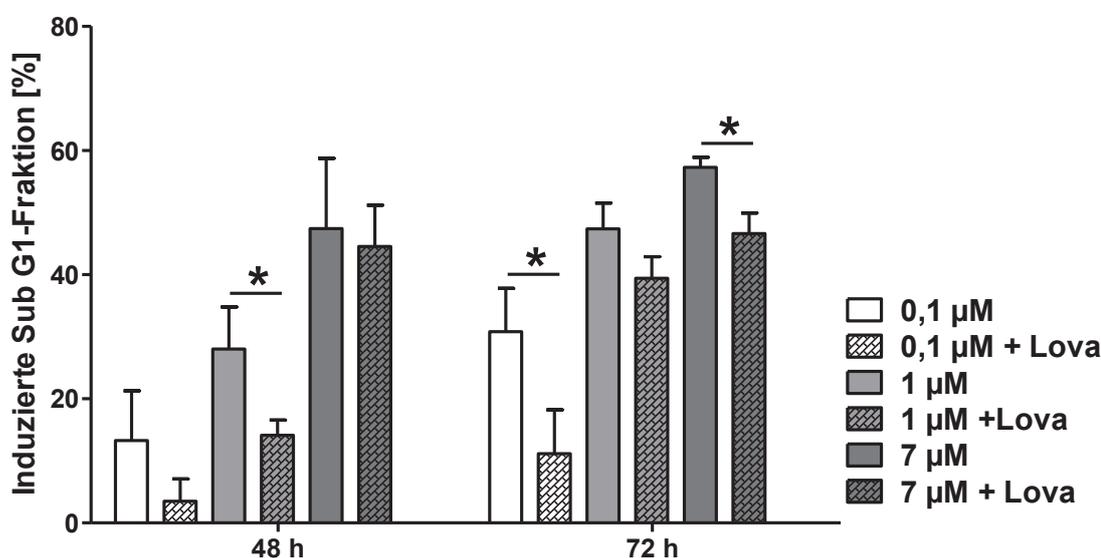


Abb. 25 Modulation der Doxorubicin-induzierten SubG1-Fraktion durch eine Vorbehandlung mit Lovastatin. Die HaCaT-Zellen wurden optional für 24 h mit 30 μM Lovastatin und anschließend für 2 h mit Doxorubicin behandelt. Die Behandlung wurde analog zum Resazurin-Reduktionstest durchgeführt. Die Aufarbeitung und durchflusszytometrische Untersuchung erfolgten 48 h und 72 h nach der Doxorubicinbehandlung. Normalisiert wurden die Ergebnisse auf eine vorbehandelte bzw. nicht-vorbehandelte Kontrolle ($\cong 0\%$). Dargestellt ist der normalisierte Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten (ein Replikat je Bedingung). Student's t-test: * $\cong p < 0,05$, Lova- und Doxo-behandelte Zellen im Vergleich zu Doxo-behandelten Zellen.

Ebenso wie die transiente Lovastatinvorbehandlung bedingte auch eine Dauerbehandlung mit 10 μM Lovastatin eine Reduktion des Anteils der Zellpopulation in der SubG1-Fraktion (Abb. 26). Dabei war der Effekt insgesamt geringer und lediglich für eine Doxorubicinkonzentration von 1 μM zum Zeitpunkt 48 h signifikant.

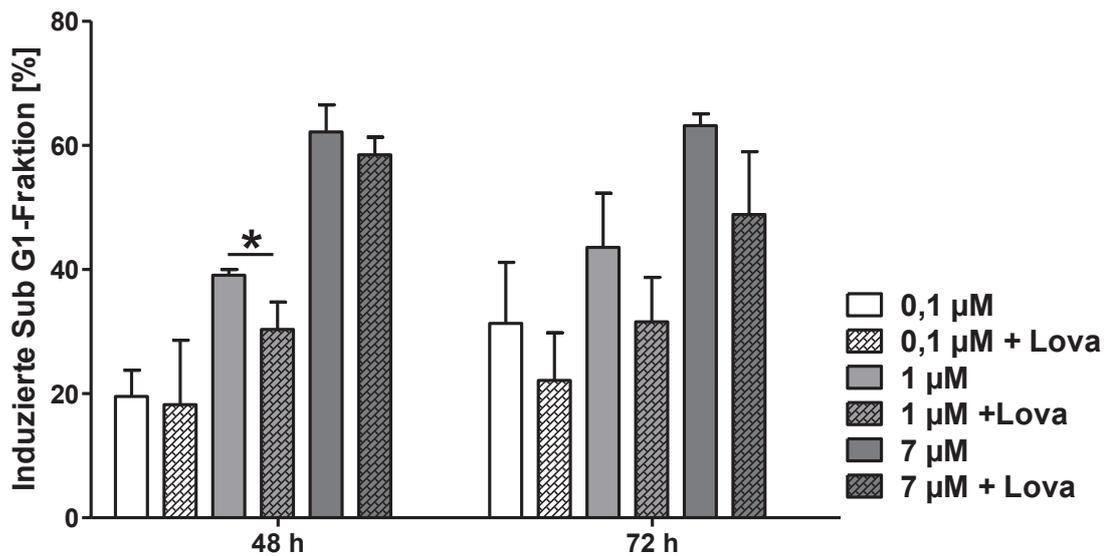


Abb. 26 Modulation der Doxorubicin-induzierten SubG1-Fraktion durch die Dauerbehandlung mit Lovastatin. Die HaCaT-Zellen wurden optional mit 10 µM Lovastatin dauerbehandelt und nach 24 h für 2 h mit Doxorubicin inkubiert. Die Aufarbeitung und durchflusszytometrische Untersuchung erfolgten 48 h und 72 h nach der Doxorubicinbehandlung. Normalisiert wurden die Ergebnisse auf eine vorbehandelte bzw. nicht-vorbehandelte Kontrolle ($\cong 0\%$). Dargestellt ist der normalisierte Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten (ein Replikat je Bedingung). Student's t-test: * $\cong p < 0,05$, Lova- und Doxo-behandelte Zellen im Vergleich zu Doxo-behandelten Zellen.

Ebenso wie durch ionisierende Strahlung wurde auch durch Doxorubicin die SubG1-Fraktion deutlich vergrößert, was mit dem Ergebnis der Viabilitätsmessung korrelierte. Gleichzeitig bedingte Lovastatin durch zytoprotektive Mechanismen eine Reduktion dieser zytotoxischen Doxorubicinwirkung. Mögliche Erklärungsansätze sind neben einem Zellzyklusarrest, insbesondere eine verbesserte Reparatur der DNA-Schäden. Zunächst blieb aber der Einfluss von Lovastatin und Doxorubicin auf den Zellzyklus zu klären.

4.2.4 Lovastatin reduziert den Doxorubicin-induzierten Zellzyklusblock

Die Abbildungen 28 und 30 stellen die Doxorubicin-bedingten Veränderungen der Zellzyklusverteilung und die Modulation dieser durch eine transiente Vorbehandlung mit 30 µM Lovastatin oder einer Dauerbehandlung mit 10 µM Lovastatin dar.

Im Gegensatz zu dem strahlungsinduzierten Einfluss auf den Zellzyklus, der sich mit zunehmender Strahlendosis verstärkte, zeigten sich bei Steigerung der Doxorubicinkonzentration konträre Effekte. Während eine Konzentration von 0,1 µM Doxorubicin die Zellzyklusverteilung nicht beeinflusste, entstand durch die Anwendung von 1 µM Doxorubicin ein G₂-Block (Pfeil in Abb. 27), der annähernd 80 % der Zellpopulation einschloss. Eine Konzentration von 7 µM Doxorubicin führte hingegen zu

Ergebnisse

einer deutlichen Abnahme des Anteils der Zellpopulation in der G₂-Phase, wobei die Zellen am ehesten der G₁- und der S-Phase zuzuordnen waren. Die Zuordnung der Zellen insbesondere zur S-Phase war jedoch nur näherungsweise möglich, wie man den beigefügten exemplarischen Bildern der durchflusszytometrischen Analysen entnehmen kann.

Die Lovastatinvorbehandlung (Abb. 28) reduzierte signifikant die Zunahme des Anteils der Zellpopulation in der S-Phase nach einer Behandlung mit 7 μM Doxorubicin, sowie den G₂-Block, der durch 1 μM Doxorubicin induziert wurde. Die Lovastatindauerbehandlung (Abb. 30) hatte keine signifikante Wirkung auf die Doxorubicin-induzierten Zellzyklusveränderungen.

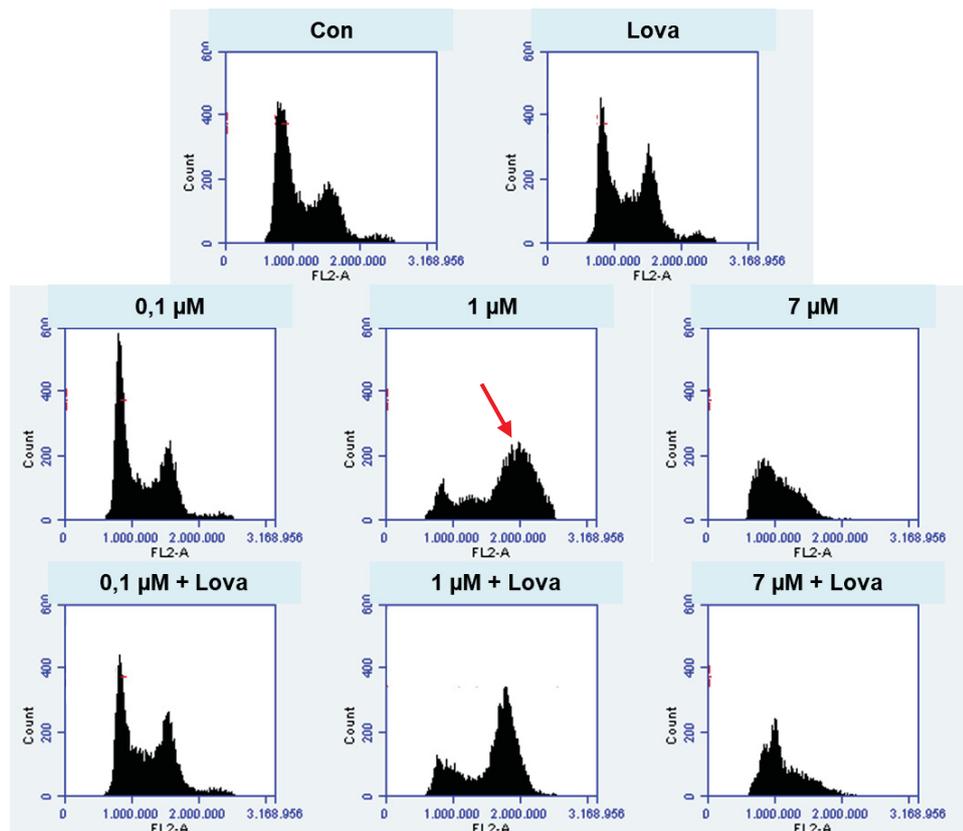


Abb. 27 Exemplarische Bilder der Durchflusszytometrie nach einer Vorbehandlung Doxorubicin-behandelter HaCaT-Zellen mit Lovastatin. Die HaCaT-Zellen wurden optional für 24 h mit 30 μM Lovastatin vorbehandelt und anschließend für 2 h mit Doxorubicin inkubiert. Die Behandlung wurde analog zum Resazurin-Reduktionstest durchgeführt. Aufarbeitung und durchflusszytometrische Untersuchung erfolgten 48 h nach dem Ende der Behandlung mit Doxorubicin. Der rote Pfeil markiert den Doxorubicin-induzierten G₂-Block.

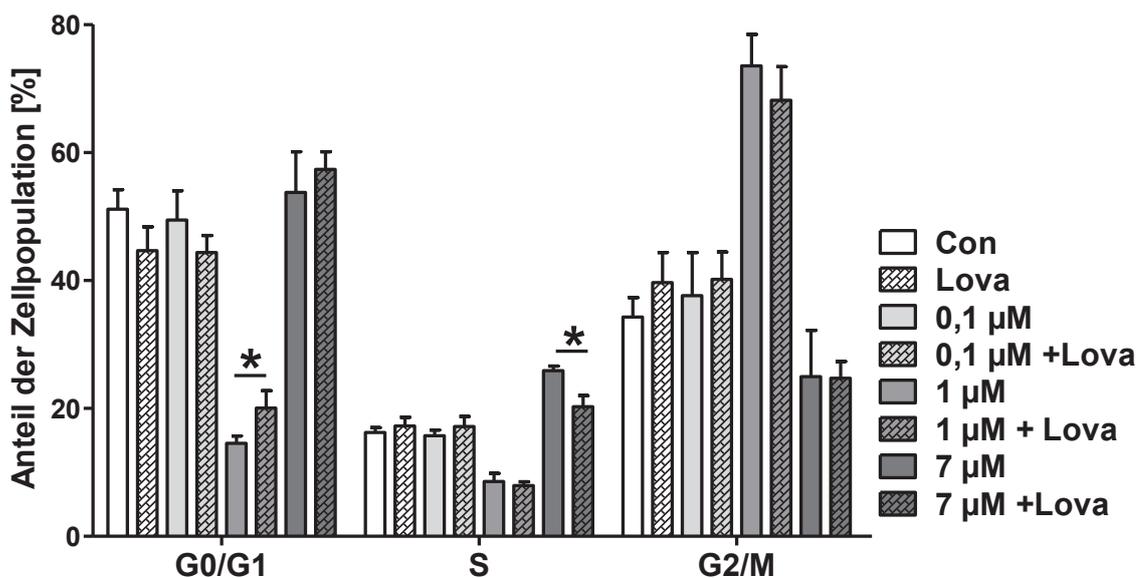


Abb. 28 Modulation der Doxorubicin-induzierten Effekte auf den Zellzyklus durch eine Vorbehandlung mit Lovastatin. Die HaCaT-Zellen wurden optional für 24 h mit 30 µM Lovastatin und anschließend für 2 h mit Doxorubicin inkubiert. Die Behandlung wurde analog zum Resazurin-Reduktionstest durchgeführt. Die Aufarbeitung und durchflusszytometrische Untersuchung erfolgten 48 h und 72 h nach der Doxorubicinbehandlung. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD von drei unabhängigen Experimenten (ein Replikat je Bedingung). Student's t-test: * \triangleq p < 0,05, Lova- und Doxo-behandelte Zellen im Vergleich zu Doxo-behandelten Zellen.

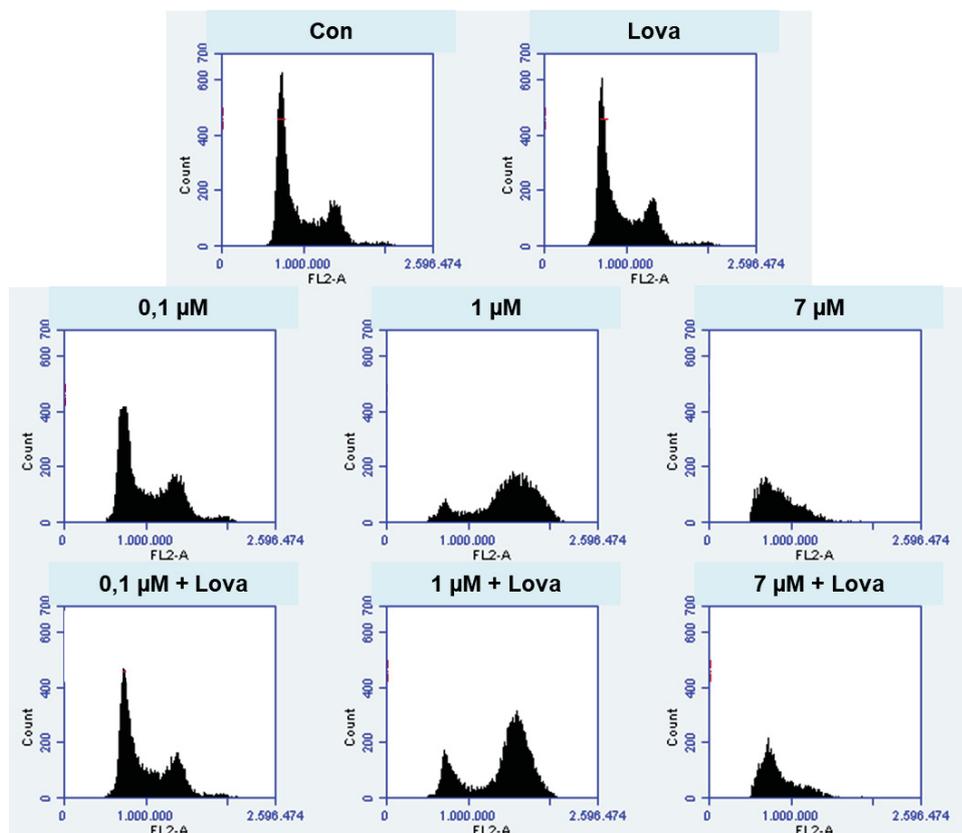


Abb. 29 Exemplarische Bilder der Durchflusszytometrie nach einer Dauerbehandlung Doxorubicin-behandelter HaCaT-Zellen mit Lovastatin. Die HaCaT-Zellen wurden optional mit Lovastatin dauerbehandelt und für 2 h mit Doxorubicin inkubiert. Die Behandlung wurde analog zum Resazurin-Reduktionstest durchgeführt. Aufarbeitung und durchflusszytometrische Untersuchung erfolgten 48 h nach dem Ende der Behandlung mit Doxorubicin.

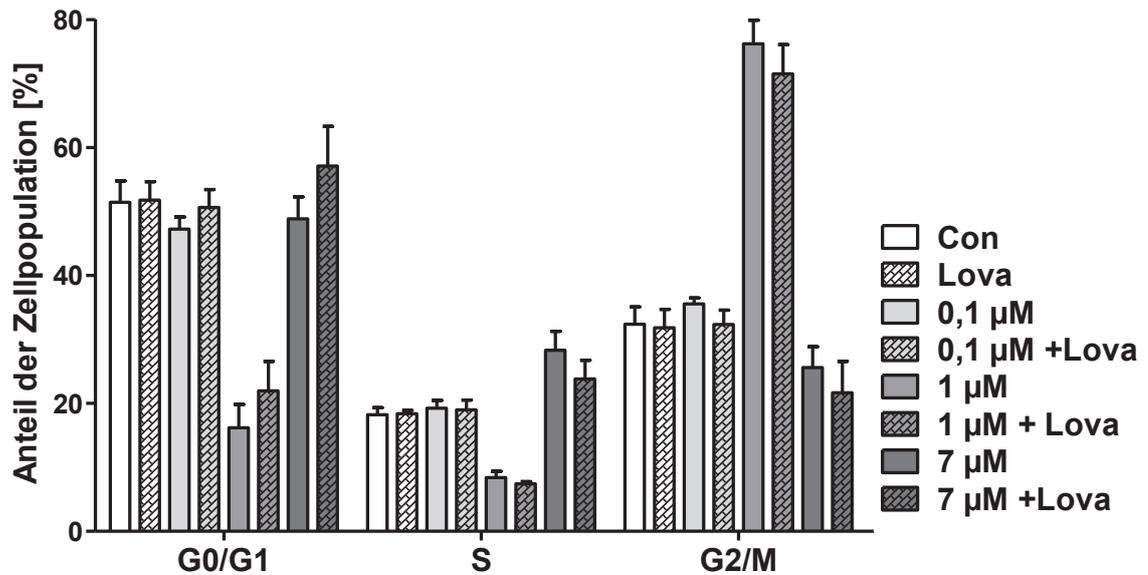


Abb. 30 Modulation der Doxorubicin-induzierten Effekte auf den Zellzyklus durch eine Dauerbehandlung mit Lovastatin. Die HaCaT-Zellen wurden optional mit 10 µM Lovastatin dauerbehandelt und nach 24 h für 2 h mit Doxorubicin inkubiert. Die Aufarbeitung und durchflusszytometrische Untersuchung erfolgten 48 h und 72 h nach der Doxorubicinbehandlung. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD von drei unabhängigen Experimenten (ein Replikat je Bedingung).

Abschließend ist festzustellen, dass die signifikanten zytoprotektiven Lovastatineffekte, die sich im Rahmen der Viabilitätsuntersuchungen zeigten nicht gänzlich durch das Ergebnis der Zellzyklusanalyse zu erklären sind. Der Doxorubicin-induzierte Zellzyklusblock wurde nicht durch Lovastatin aufgehoben. Auf der Basis dieser Ergebnisse ist die Hypothese aufzustellen, dass die zytoprotektive Lovastatinwirkung auf einer verbesserten DNA-Schadenantwort beruht. Im Weiteren wurde die Modulation der Induktion und Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Lovastatin nach einer Bestrahlung oder Doxorubicinbehandlung der Zellen untersucht.

4.3 Ko-lokalisierte γ H2AX- und 53BP1-Foci als Surrogatmarker für DNA-Doppelstrangbrüche

Sowohl ionisierende Strahlung als auch Doxorubicin können DNA-Doppelstrangbrüche induzieren. Als Surrogatmarker für diese werden ko-lokalisierte γ H2AX- und 53BP1-Foci herangezogen. Die Auswertung der ko-lokaliserten Foci erhöht nicht nur die Sensitivität der Methode gegenüber der alleinigen Quantifizierung von γ H2AX Foci, sondern stellt vor

allem mit größtmöglicher Wahrscheinlichkeit sicher, dass es sich bei den Foci auch tatsächlich um DNA-Doppelstrangbrüche handelt [119].

Es stellt sich die Frage, ob die Abnahme der Viabilität durch ionisierende Strahlung und Doxorubicin, die mit einer Zunahme der SubG1-Fraktion korrelierte, durch die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen bedingt war oder andere Schädigungsmechanismen im Vordergrund standen. Insbesondere ist jedoch die These zu klären, ob Lovastatin die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen verhindert oder deren Reparatur beschleunigt. Dies könnte die zytoprotektive Lovastatinwirkung im Rahmen des Resazurin-Reduktionstests und der Durchflusszytometrie erklären.

Das Inkubationsschema wurde entsprechend dem der vorangegangenen Experimente gewählt. Die mit 2 Gy bestrahlten Zellen wurden nach 0,5 h und 8 h immunzytochemisch aufgearbeitet. Die Doxorubicinbehandlung erfolgte mit 0,1 μ M für 2 h und der anschließende Nachinkubationszeitraum lag bei 2 h bzw. 8 h.

Zunächst ist festzustellen, dass Lovastatin in dieser Versuchsanordnung nur einzelne Foci und damit mit größtmöglicher Wahrscheinlichkeit lediglich sehr wenige DNA-Doppelstrangbrüche induzierte (Abb. 31-34).

4.3.1 Lovastatin reduziert die Anzahl strahlungsinduzierter Foci signifikant

In Abb. 32 ist die quantitative Auswertung der Foci nach der Behandlung der Zellen mit ionisierender Strahlung und optionaler transientser Vorbehandlung dargestellt. Wie auch den exemplarischen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 31) zu entnehmen ist, waren in den Lovastatin-behandelten Zellen in etwa so viele Foci zu zählen wie in der unbehandelten Kontrolle. Während in der unbehandelten und der mit Lovastatin behandelten Kontrolle im Durchschnitt weniger als 2 Foci erkennbar waren, induzierte eine Bestrahlung mit 2 Gy nach 0,5 h etwa 12 Foci. Durch die Wirkung verschiedener Reparaturmechanismen in den folgenden Stunden, zeigten sich nach 8 Stunden etwa 8 Foci. Während Lovastatin die initiale Induktion der Foci nicht beeinflusste, konnten nach 8 Stunden im Durchschnitt lediglich 6 Foci gezählt werden. Eine transiente Vorbehandlung mit 30 μ M Lovastatin reduzierte damit die Anzahl der Foci um 25 % gegenüber den nicht-vorbehandelten, bestrahlten Zellen.

Ergebnisse

Grundsätzlich gibt es zwei mögliche Erklärungsansätze für die Reduktion der Foci 8 h nach der Bestrahlung durch eine transiente Vorbehandlung mit 30 μ M Lovastatin: Zum einen eine verbesserte Reparatur der strahlungsinduzierten DNA-Doppelstrangbrüche und zum anderen eine Proliferationshemmung.

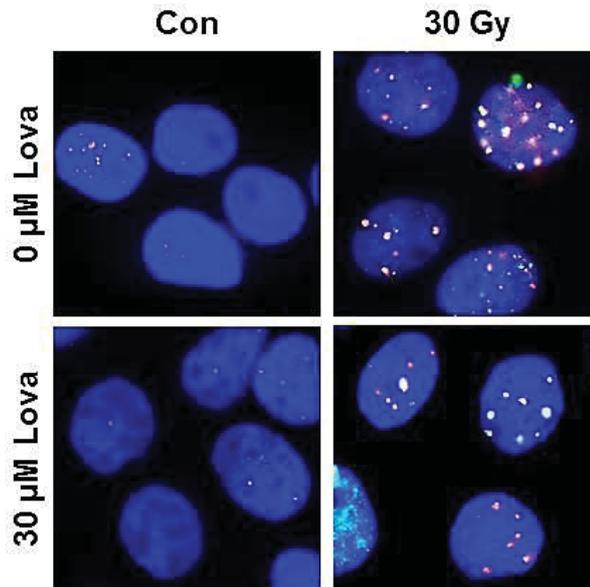


Abb. 31 Fluoreszenzmikroskopische Bilder der bestrahlten HaCaT-Zellen mit optionaler Lovastatinvorbehandlung. Nach 24-stündiger Präinkubation mit 30 μ M Lovastatin wurden die HaCaT-Zellen mit 2 Gy bestrahlt und nach 0,5 h sowie 8 h immunzytochemisch aufgearbeitet. Blau erscheint der Zellkern, grün die γ H2AX-, rot die 53BP1-Foci. Orange sind ko-lokalisierte Foci abgebildet. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder bilden den Zeitpunkt 8 h ab.

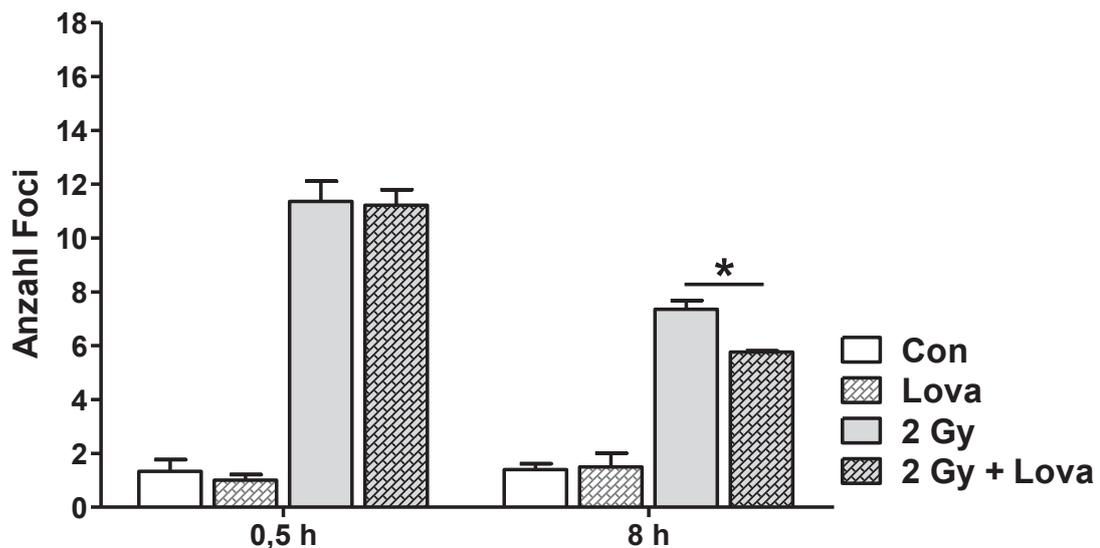


Abb. 32 Modulation der strahlungsinduzierten ko-lokalisieren Foci durch eine Vorbehandlung mit Lovastatin. Nach 24-stündiger Vorbehandlung mit 30 μ M Lovastatin wurden die HaCaT-Zellen mit 2 Gy bestrahlt und nach 0,5 h sowie 8 h immunzytochemisch aufgearbeitet. Gezählt wurden ko-lokalisieren γ H2AX- und 53BP1-Foci. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten. N = 50. Student's t-test: * \triangleq p < 0,05, Lova-behandelte, bestrahlte Zellen im Vergleich zu bestrahlten Zellen.

4.3.2 Lovastatin reduziert die Anzahl Doxorubicin-induzierter Foci signifikant

Wie Abb. 33 zu entnehmen ist, nahm die Anzahl der Doxorubicin-induzierten Foci im Gegensatz zu den strahlungsinduzierten Foci über das gesamte Beobachtungsintervall stetig zu. 2 Stunden nach dem Ende der Inkubation mit Doxorubicin waren etwa 10 Foci entstanden, weitere 6 Stunden später lag die Anzahl bereits bei etwa 16 Foci.

Durch die Präinkubation mit Lovastatin konnte an beiden Messzeitpunkten die Anzahl der Foci signifikant reduziert werden. Sie betrug dann lediglich 4 bzw. 6 Foci pro Schnittebene. Somit halbierte eine Vorbehandlung mit 30 μM Lovastatin nahezu die Anzahl der Foci zwischen den beiden Messzeitpunkten. Während die absolute Anzahl der Foci durch die Vorbehandlung mit Lovastatin deutlich reduziert wurde, hatte die Vorbehandlung keinen Einfluss auf die relative Zunahme der Foci. Diese lag sowohl bei den vorbehandelten Zellen als auch bei den nicht-vorbehandelten Zellen bei etwa 60 %. Damit scheint die Präinkubation keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Entstehung der Foci und somit der DNA-Doppelstrangbrüche zu haben.

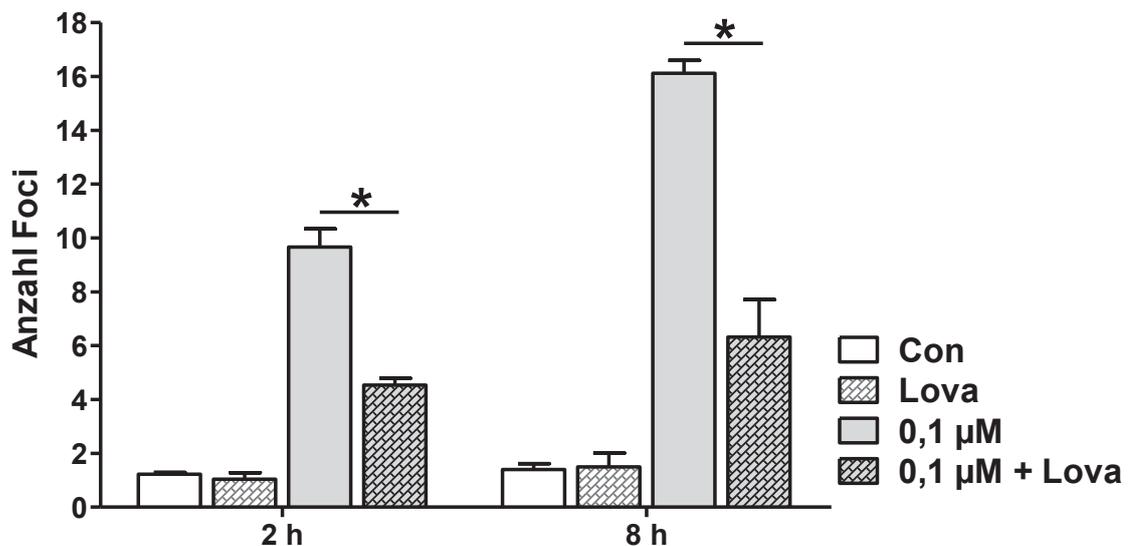


Abb. 33 Modulation der Doxorubicin-induzierten ko-lokalisierten Foci durch eine Vorbehandlung mit Lovastatin. Nach 24-stündiger Präinkubation mit 30 μM Lovastatin wurden die HaCaT-Zellen mit 0,1 μM Doxorubicin behandelt und nach 2 h sowie 8 h immunzytochemisch aufgearbeitet. Gezählt wurden ko-lokalisierte γH2AX - und 53BP1-Foci. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten. N = 50. Student's t-test: * \cong p < 0,05, Lova- und Doxo-behandelte Zellen im Vergleich zu Doxo-behandelten Zellen.

In Abb. 34 sind fluoreszenzmikroskopische Bilder der Zellen dargestellt, die die Modulation der Doxorubicinwirkung durch die Vorbehandlung mit 30 μM Lovastatin abbilden. Die Foci der Zellen, die kombiniert mit Lovastatin und Doxorubicin behandelt

Ergebnisse

wurden, waren an beiden Messzeitpunkten nach der immunzytochemischen Färbung deutlich größer als die der alleine mit Doxorubicin-behandelten Zellen.

Dieses Phänomen war weder bei der Lovastatinkontrolle noch bei den bestrahlten Zellen, die mit Lovastatin vorbehandelt wurden, zu sehen (Abb. 31). Es ist zu vermuten, dass es einen direkten Zusammenhang mit der kombinierten Behandlung mit Lovastatin und Doxorubicin gibt.

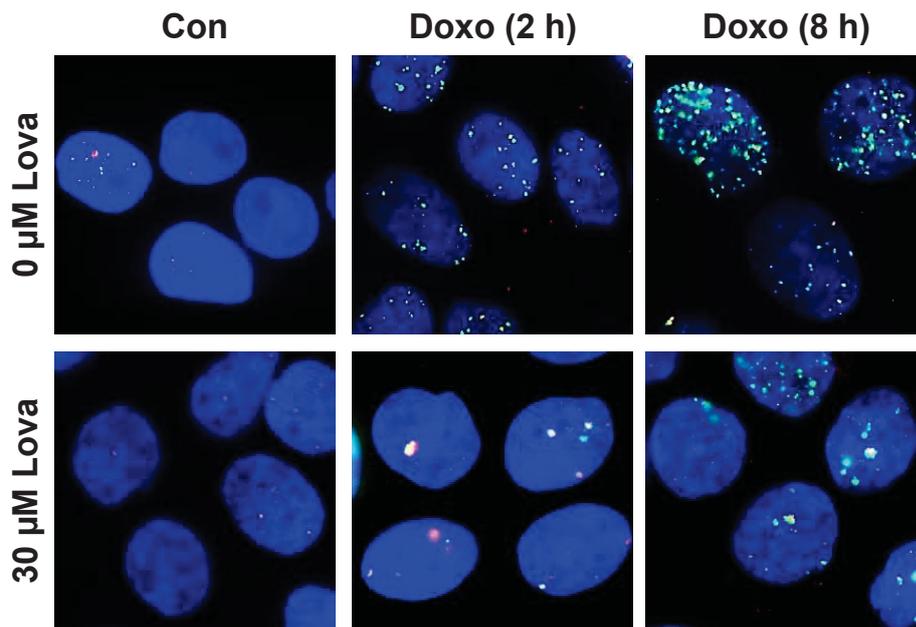


Abb. 34 Fluoreszenzmikroskopische Bilder der Doxorubicin-behandelten HaCaT-Zellen mit optionaler Lovastatinvorbehandlung. Nach 24-stündiger Präinkubation mit 30µM Lovastatin wurden die HaCaT-Zellen für 2 h mit Doxorubicin inkubiert und nach 2 h sowie 8 h immunzytochemisch aufgearbeitet. Blau erscheint der Zellkern, grün die γ H2AX-, rot die 53BP1-Foci. Orange sind ko-lokalisierte Foci abgebildet.

Abschließend ist festzustellen, dass die Vorbehandlung mit Lovastatin die Entstehung der Foci und damit von DNA-Doppelstrangbrüchen signifikant reduzierte.

Es bleibt die Frage zu klären, ob durch Lovastatin die Entstehung verhindert oder die vorhandenen Doppelstrangbrüche effektiver repariert werden. In den folgenden Experimenten sollte zunächst untersucht werden in weit proliferative und antiproliferative Effekte die Lovastatinwirkung erklären können.

4.4 Die zytoprotektiven Effekte von Lovastatin beruhen nicht auf einer Proliferationshemmung

Der EdU-Einbau dient als S-Phase Marker. Dabei entspricht der Einbau von EdU der aktiven DNA-Synthese in der S-Phase. Somit kann er als direkter Marker für die Zellproliferation gewertet werden [120]. Die Auswertung war nur näherungsweise möglich, denn neben den eindeutig EdU-positiven Zellen, die einen weitgehend homogen hellgrünen Zellkern aufweisen und den eindeutig negativen Zellen, die blau erschienen, kamen auch verschiedene Intermediärformen vor. Diese wurden bei der Auswertung als EdU-negativ klassifiziert.

Für eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse entsprach das Behandlungsschema dem der vorangegangenen Experimente bei einer Strahlendosis von 2 Gy und einer Doxorubicinkonzentration von 0,1 μ M. Die EdU-Inkorporation wurde 24 h nach der Bestrahlung oder der Doxorubicinbehandlung durchgeführt.

Lovastatin bedingte in den vorausgegangenen Experimenten eine reduzierte Viabilitätsabnahme, eine kleinere SubG1-Fraktion und eine geringere Anzahl von DNA-Doppelstrangbrüchen nach der Zellbehandlung mit ionisierender Strahlung oder Doxorubicin. Darüber hinaus konnte eine Abnahme des strahlungsinduzierten G2-Blocks sowie des Doxorubicin-induzierten G1- bzw. G2-Blocks festgestellt werden. Ungeklärt ist dabei, ob es sich um zytoprotektive Mechanismen, wie z.B. eine verbesserte DNA-Schadenantwort, handelte oder es lediglich zu einer Proliferationshemmung der Zellen durch die Lovastatinbehandlung kam.

Das Ziel der Untersuchung des EdU-Einbaus war es primär, eine Lovastatin-bedingte Proliferationshemmung als Ursache der festgestellten zytoprotektiven Lovastatineffekte auszuschließen. Gleichzeitig sind auch Aussagen darüber möglich, ob ionisierende Strahlung oder Doxorubicin einen Zellarrest in der S-Phase bedingen.

In Abb. 35 werden exemplarisch fluoreszenzmikroskopische Bilder der Zellen nach der jeweiligen Behandlung und der EdU-Inkorporation gezeigt. Dabei markiert Nummer 1 einen eindeutig EdU-negativen Zellkern, der sich homogen blau darstellte. Nummer 2 zeigt einen homogen grünen Zellkern, der damit als EdU-positiv klassifiziert wurde, während der Zellkern Nummer 3 wiederum den EdU-negativen zugeordnet wurde aufgrund der inhomogenen Grünfärbung. Um ein möglichst valides Ergebnis zu erhalten sind pro Bedingung und Versuch 500 Zellen ausgewertet worden.

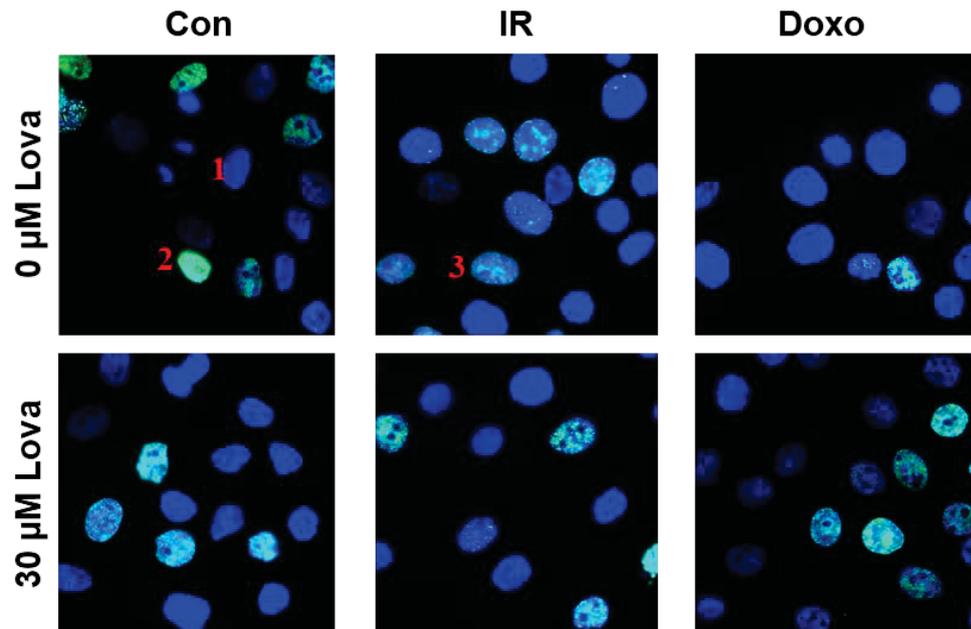


Abb. 35 Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Bilder der HaCaT-Zellen nach der EdU-Inkorporation. Die HaCaT-Zellen wurden optional für 24 h mit 30 μM Lovastatin vorbehandelt und anschließend entweder mit 2 Gy bestrahlt oder für 2 h mit 0,1 μM Doxorubicin inkubiert. Die 20-minütige EdU-Inkorporation und daran anschließende immunzytochemische Aufarbeitung der Zellen erfolgte 24 h nach der Bestrahlung bzw. dem Ende der Doxorubicinbehandlung. Blau: EdU-negativ (1). Grün: EdU-positiv (2). Inhomogen grünlich: EdU-negativ (3)

Das Ergebnis der quantitativen Auswertung des Anteils EdU-positiver Zellen an der Gesamtpopulation ist Abb. 36 zu entnehmen.

Die alleinige Behandlung mit Lovastatin reduzierte die Anzahl der EdU-positiven Zellen im Mittel um etwa 10 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Lovastatin bedingte demnach entweder eine Reduktion des Zellanteils in der S-Phase oder eine geringere Aktivität der Zellen in der S-Phase.

Ionisierende Strahlung führte ebenfalls zu einer etwa 10 %-igen Abnahme des Anteils der Zellpopulation in der S-Phase gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Durch eine Pulsbehandlung mit 30 μM Lovastatin wurde der Anteil der EdU-positiven Zellen geringfügig erhöht. Er lag jedoch auch nach der Ko-Behandlung noch deutlich unter dem Wert der unbehandelten Kontrolle.

Die Inkubation mit 0,1 μM Doxorubicin reduzierte den Anteil der EdU-positiven Zellen um etwa 20 % auf 12 % der Zellpopulation. Die Präinkubation mit 30 μM Lovastatin steigerte den Anteil der EdU-positiven Zellen auf das Niveau der Lovastatin-behandelten Kontrolle und damit um etwa 100 %.

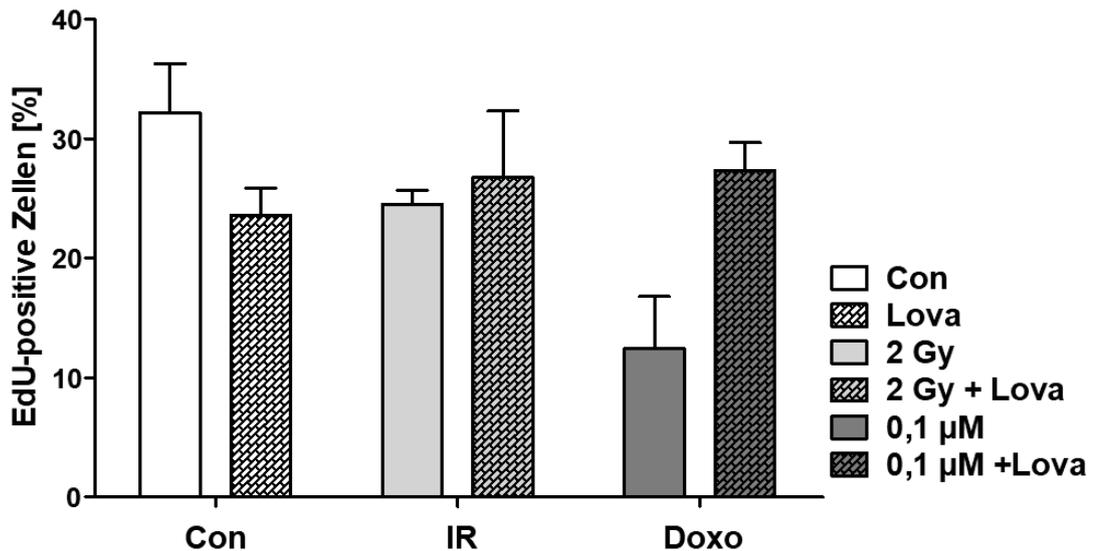


Abb. 36 Lovastatinwirkung auf die EdU-Inkorporation bestrahlter oder Doxorubicin-behandelter HaCaT-Zellen. Die HaCaT-Zellen wurden optional für 24 h mit 30 μM Lovastatin vorbehandelt und anschließend entweder mit 2 Gy bestrahlt oder für 2 h mit 0,1 μM Doxorubicin inkubiert. Die 20-minütige EdU-Inkorporation und daran anschließende immunzytochemische Aufarbeitung der Zellen erfolgte 24 h nach der Bestrahlung bzw. dem Ende der Doxorubicinbehandlung. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD von zwei unabhängigen Experimenten. N = 500.

Die Daten der Quantifizierung der EdU-Inkorporation deuten darauf hin, dass weder Lovastatin, noch Doxorubicin oder ionisierende Strahlung einen Zellzyklusarrest in der S-Phase bedingten. Bei Gültigkeit der Annahme, dass die Quantifizierung der S-Phase bzw. die Quantifizierung der Zellaktivität in der S-Phase die Proliferation einer Zellpopulation hinreichend beschreiben, konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass der zytoprotektive Effekt von Lovastatin nicht auf einer Proliferationshemmung beruht. Vielmehr wurde die Proliferation nach einer Doxorubicinbehandlung durch die Präinkubation mit 30 μM Lovastatin deutlich verbessert und jene nach Anwendung ionisierender Strahlung nicht beeinflusst.

Fraglich ist weiterhin, welche molekularen Mechanismen den zytoprotektiven Effekt von Lovastatin bedingen. Aus diesem Grund schloss sich eine Untersuchung molekularer Mechanismen der Lovastatinwirkung mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR an.

4.5 Analyse der genoprotektiven Mechanismen von Lovastatin gegenüber ionisierender Strahlung

Eine Präinkubation mit 30 μM Lovastatin bedingte bei der bestrahlten Zellpopulation eine Reduktion der Viabilitätsabnahme und einen geringeren Zellanteil in der SubG1-Fraktion bei der durchflusszytometrischen Untersuchung. Bei der immunzytochemische Färbung und den damit dargestellten ko-lokalisierten γH2AX -, sowie 53BP1-Foci waren weniger initiale DNA-Schäden und eine verbesserte DNA-Reparatur bei einer Vorbehandlung der Doxorubicin-inkubierten Zellen mit 30 μM Lovastatin zu beobachten. Auch in den bestrahlten Zellen kam es zu einer verbesserten DNA-Reparatur durch die Lovastatinvorbehandlung. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Lovastatinvorbehandelten Zellen eine höhere Resilienz gegenüber dem schädigenden Agens aufwiesen. Um die protektiven Effekte von Lovastatin genauer zu charakterisieren, erfolgte die Untersuchung möglicher molekularer Mechanismen mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR.

Die Zellen wurden zunächst optional mit 30 μM Lovastatin vorbehandelt, bevor eine Bestrahlung mit 10 Gy erfolgte. Die RNA-Isolation wurde 24 h nach der Bestrahlung durchgeführt. Bei den untersuchten Genen handelt es sich um Regulatoren der DNA-Schadenantwort und -Reparatur, sowie der zellulären Stressantwort, der Zellzyklusregulation und der Apoptose.

Die Zellviabilität und der Zellanteil in der SubG1-Fraktion wurden 48 h nach der Bestrahlung am stärksten durch die transiente Vorbehandlung mit 30 μM Lovastatin beeinflusst. Es war daher zu vermuten, dass die Genregulation, die der veränderten Sensitivität der Zellen zugrunde lag, eine gewisse Zeit vor dem Effekt auf zellulärer Ebene ablaufen musste. Aus diesem Grund wurde ein Nachinkubationszeitraum von 24 h nach der Behandlung und vor der RNA-Isolation festgelegt.

Da pro Bedingung mehrere Zellkulturschalen verwendet wurden, um eine ausreichende RNA-Menge isolieren zu können, mussten die gewonnenen Eluate zusammengeführt werden. Im Anschluss an das Zusammenführen ergaben Messungen einen RNA-Gehalt von 877,6 ng/ μl in der unbehandelten Kontrolle, von 615,2 ng/ μl in der Lovastatin-behandelten Kontrolle, von 874 ng/ μl und von 710,4 ng/ μl im Eluat der nicht-vorbehandelten, bestrahlten bzw. im Eluat der vorbehandelten, bestrahlten Zellen.

4.5.1 Lovastatin und ionisierende Strahlung induzieren eine Stressantwort auf molekularer Ebene

In Abb. 37 ist die quantitative Auswertung der veränderten Genexpression durch eine transiente Vorbehandlung mit 30 μ M Lovastatin gegenüber der unbehandelten Kontrolle dargestellt. Zur Normalisierung dienten ACTB und GAPDH.

Die alleinige Inkubation mit 30 μ M Lovastatin für 24 h führte zu einer Hochregulation von 8 Genen und der Herunterregulation eines Genes gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Neben der Hochregulation von Genen der Zellzykluskontrolle und insbesondere der Zellzyklusprogression mit den Genen Ccna1, Ccne1, Cdkn1, wurden auch Atg7 und Fos verstärkt exprimiert. Atg7 reguliert neben der Autophagie auch den Zellzyklus durch eine Modulation von p53 [126]. Fos ist als Protoonkogen in die Regulation der Zellproliferation, -differenzierung und -transformation eingebunden [127]. Lovastatin selbst löste darüber hinaus eine Stress- und Inflammationsreaktion aus, was die verstärkte Expression von Gadd45a, Mmp3, Atg7 und Il-6 zeigte. Interessanterweise war die Polymerase Pole als Reparaturmarker herunterreguliert.

Es ist zu resümieren, dass eine Konzentration von 30 μ M Lovastatin trotz seiner protektiven Wirkung einen Stressfaktor für die Zellen darstellte. Dieses Ergebnis deckt sich insbesondere mit dem des Resazurin-Reduktionstests, der eine Viabilitätsabnahme von 10 – 20 % für eine alleinige Behandlung der Zellen mit 30 μ M Lovastatin zeigte.

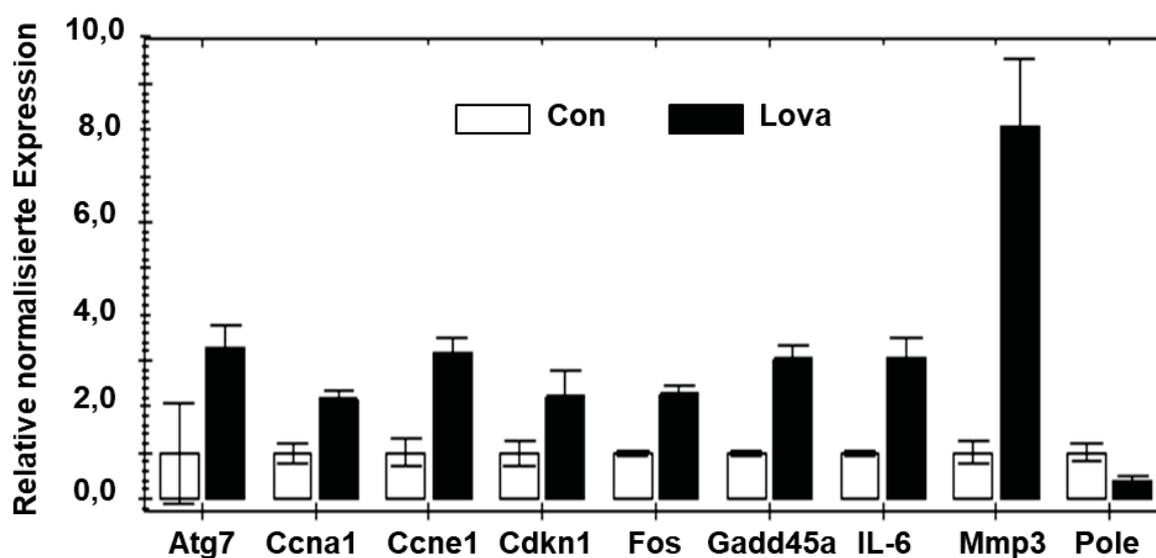


Abb. 37 Vergleichende Analyse der relativen normalisierten Genexpression nach einer Pulsbehandlung der HaCaT-Zellen mit Lovastatin. Die HaCaT-Zellen wurden für 24 h mit 30 μ M Lovastatin inkubiert. 24 h nach dem Ende der Behandlung wurde, wie unter 3.7.1 beschrieben, die RNA-Isolation durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten normalisiert auf ACTB und GAPDH.

Ergebnisse

Ebenso wie Lovastatin bewirkte auch die Behandlung der Zellen mit ionisierende Strahlung eine veränderte Genexpression gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Abb. 38 zeigt die quantitative Auswertung normalisiert auf ACTB und GAPDH.

Gegenüber der unbehandelten Kontrolle bewirkte die Behandlung der Zellpopulation mit ionisierender Strahlung sowohl eine verstärkte inflammatorische Antwort als auch eine vermehrte Stressantwort. Als Zeichen der Inflammation ist die Hochregulation von Cxcr4 und Il-6 zu werten. Während Cyp1a1 eine Gruppe der Cytochrom-P450-Enzyme kodiert [128]. Atg7 reguliert p53-abhängig den Zellzyklus und Fos reguliert als Protoonkogen die Zellproliferation [126, 127].

Zusammenfassend kann die Hochregulation von Cyp1a1, Atg7 und Fos als Stressantwort auf die genotoxische und zytotoxische Wirkung von ionisierender Strahlung eingeordnet werden. Insofern bestätigt sich der zytotoxische Effekt von ionisierender Strahlung, der sich unter anderem im Rahmen einer Viabilitätsreduktion und einer Zunahme des Anteils der Zellpopulation an der SubG1-Fraktion manifestierte.

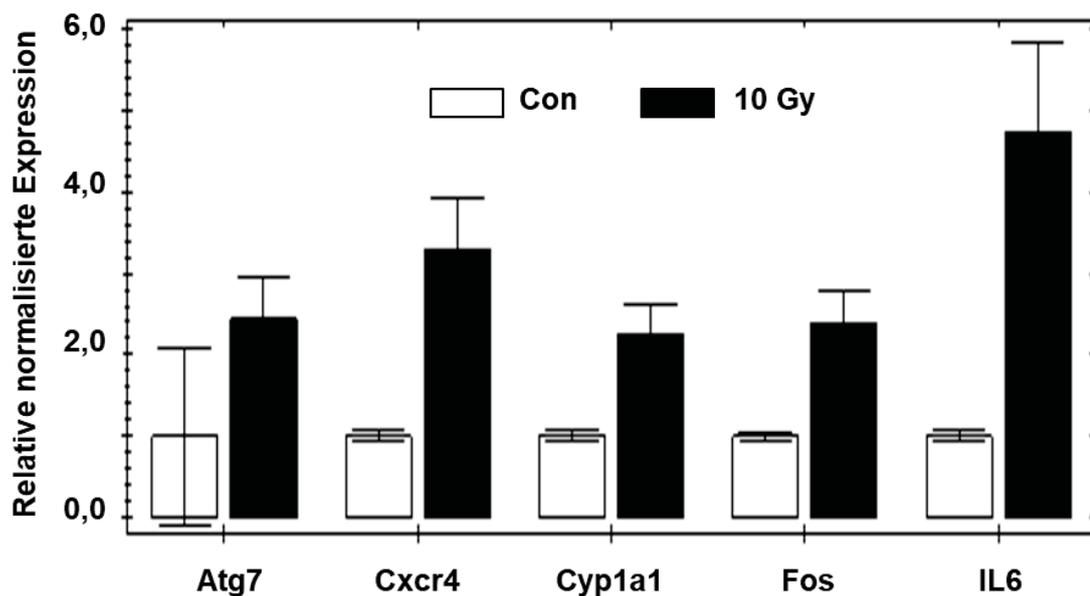


Abb. 38 Vergleichende Analyse der relativen normalisierten Genexpression nach einer Bestrahlung der HaCaT-Zellen. Die HaCaT-Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen mit 10 Gy bestrahlt. 24 h später wurde, wie unter 3.7.1 beschrieben, die RNA-Isolation durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten normalisiert auf ACTB und GAPDH.

4.5.2 Lovastatin moduliert die strahlungsinduzierte DNA-Schadenantwort

In Abbildung 39 findet sich eine vergleichende Darstellung der Genregulation durch Lovastatin, ionisierende Strahlung und eine Lovastatinvorbehandlung bestrahlter Zellen, wobei die quantitative Auswertung auf ACTB und GAPDH normalisiert wurde.

Von größerem Interesse als eine Genregulation durch die alleinige Behandlung mit Lovastatin oder ionisierender Strahlung war der Einfluss der kombinierten Behandlung auf Genexpressionsebene. Dabei ergab sich die Fragestellung, ob eine Hoch- oder Herunterregulation von Genen durch ionisierende Strahlung durch die vorgeschaltete Pulsbehandlung mit 30 μ M Lovastatin beeinflusst wird.

Zunächst ist festzustellen, dass die Expression keines der in Abb. 38 gezeigten Gene durch eine Vorbehandlung mit 30 μ M Lovastatin beeinflusst wurde. Aus diesem Grund wurden für die Bestimmung des Effekts der Lovastatinvorbehandlung auch Gene herangezogen, deren relative normalisierte Expression sich lediglich um den Faktor 1,5 durch die Bestrahlung geändert hatte.

Ionisierende Strahlung bewirkte eine Stressantwort der Zellen, was die verstärkte Expression von Nos3 und Timp2 zeigte. Dabei wurde Nos3 dreifach hochreguliert durch die ionisierende Strahlung, während die Vorbehandlung mit Lovastatin die Expression auf 20 % des Wertes der unbehandelten Kontrolle reduzierte. Timp2, das für Matrix-Metalloproteasen kodiert, wurde 2-fach hochreguliert nach der Bestrahlung und durch die Vorbehandlung mit Lovastatin wiederum auf das 0,8-fache der Kontrolle herunterreguliert.

Neben der Reduktion einer verstärkten allgemeinen Stressantwort wurde auch die DNA-Schadenantwort durch die Lovastatinvorbehandlung reduziert; Chek2 war nach der Vorbehandlung mit Lovastatin annähernd im Bereich der unbehandelten Kontrolle. Infolge der Behandlung mit ionisierender Strahlung war Trp63 0,4-fach herunterreguliert, während die Vorbehandlung mit Lovastatin eine Trp63-Expression auf dem Niveau der unbehandelten Kontrolle bedingte.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass auf Genexpressionsebene Korrelate zur Lovastatin-bedingten Reduktion der strahlungsinduzierten Viabilitätsabnahme, der geringeren SubG1-Fraktion und der verbesserten DNA-Schadenantwort zu beobachten sind.

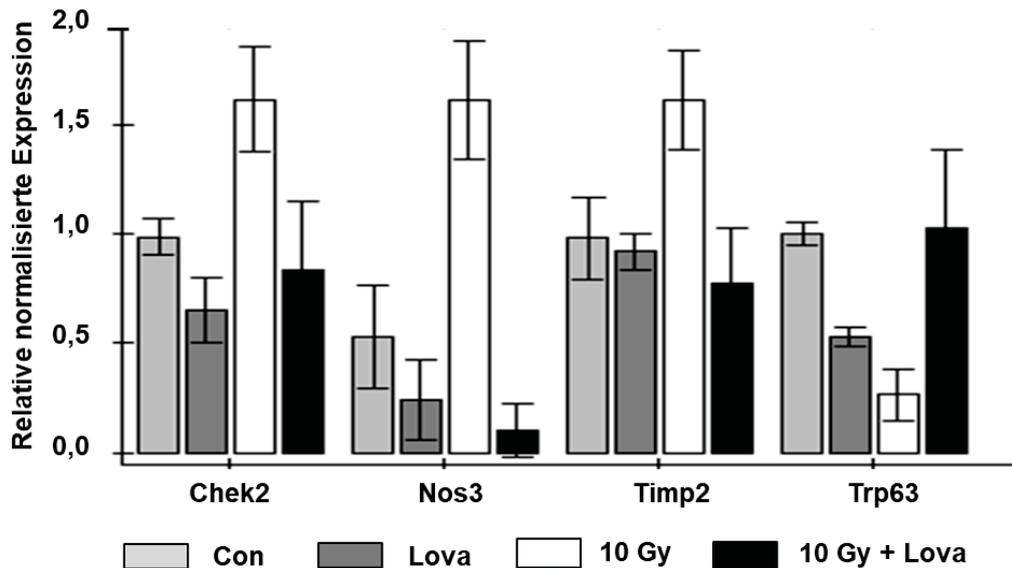


Abb. 39 Vergleichende Analyse der relativen normalisierten Genexpression bestrahlter HaCaT-Zellen nach einer Vorbehandlung mit Lovastatin. Nach einer 24-stündigen Vorbehandlung der HaCaT-Zellen mit 30 μ M Lovastatin erfolgte die Bestrahlung mit 10 Gy. 24 h später wurde, wie unter 3.7.1 beschrieben, die RNA-Isolation durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten normalisiert auf ACTB und GAPDH.

4.6 Rac1 als mögliches Zielprotein der protektiven Lovastatinwirkung

Um die Vermutung zu verifizieren, dass eine Modulation der kleinen GTPasen die Pathogenese der Mukositis beeinflussen könnte und damit einen möglichen Wirkungsmechanismus von Lovastatin darstellt, sollte durch die Anwendung des spezifischen Rac1-Inhibitors EHT 1864 die Bedeutung von Rac1 für die protektiven Lovastatineffekte untersucht werden. Die Durchführung der Experimente erfolgte für eine optimale Vergleichbarkeit analog zu denen mit Lovastatin.

4.6.1 EHT 1864 reduziert nicht die strahlungs- und Doxorubicin-induzierte Viabilitätsreduktion

Ebenso wie im Rahmen der Experimente mit Lovastatin wurde auch für EHT 1864 in einem ersten Schritt mit Hilfe des Resazurin-Reduktionstests das mögliche zytoprotektive Potential beobachtet. Um den zytoprotektiven Effekt von EHT 1864 gegenüber der Einwirkung ionisierender Strahlung zu bestimmen, wurde zunächst die Reduktion der Viabilitätsabnahme durch eine Pulsbehandlung mit 25 μ M EHT 1864 untersucht.

Ergebnisse

Einen Tag bevor die Zellen für 4 h mit 25 μM EHT 1864 vorbehandelt wurden, erfolgte das Aussäen. Im Anschluss an das Präinkubationsintervall wurde mit Dosen von 3 Gy, 10 Gy und 30 Gy bestrahlt. An die Bestrahlung schloss sich ein erneuter Mediumwechsel an, bevor die Zellen bis zu den Messzeitpunkten nach 24 h, 48 h und 72 h bei wiederum täglichem Wechsel des Mediums inkubiert wurden. Als Kontrollen dienten unbehandelte und lediglich mit EHT 1864 inkubierte Zellen. Bei der Ergebnisauswertung wurde zur besseren Vergleichbarkeit der vorbehandelten und nicht-vorbehandelten Zellen für die Normierung die jeweilige Kontrolle herangezogen. In Abb. 40 wird die Modulation der strahlungsinduzierten Zytotoxizität durch eine Pulsbehandlung mit dem spezifischen Rac1-Inhibitor EHT 1864 dargestellt. EHT 1864 bedingte bei keiner Bedingung eine signifikante Reduktion der Viabilitätsabnahme durch ionisierende Strahlung.

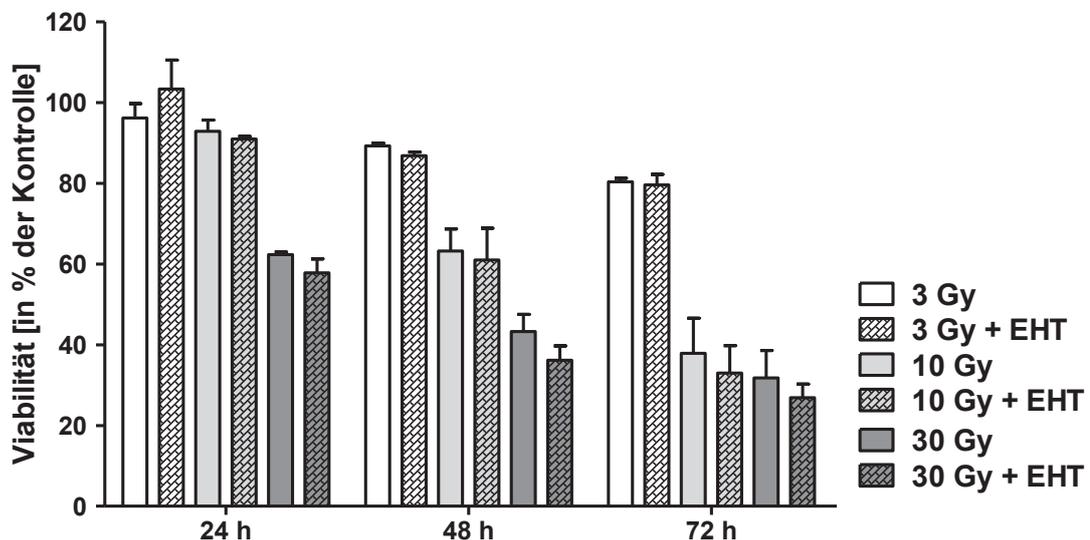


Abb. 40 Modulation der strahlungsinduzierten Zytotoxizität durch eine transiente Vorbehandlung mit EHT 1864. Die HaCaT-Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen mit 25 μM EHT 1864 vorbehandelt und nach 4-stündiger Inkubation bestrahlt. Die Messzeitpunkte (24 – 72 h) entsprechen den Zeiträumen nach der Bestrahlung. Normalisiert wurden die Ergebnisse auf die jeweilige Kontrolle ($\hat{=}$ 100 %). Für jede Bedingung wurde der Mittelwert aus 6 Replikaten gebildet. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten.

Es ist bekannt, dass Rac1 von entscheidender Bedeutung für die Funktion der Topoisomerase II ist, welches auch entscheidend die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin bedingt [86, 129]. Insofern ist die Hypothese aufzustellen, dass eine gezielte Rac1-Hemmung einen zytoprotektiven Effekt gegenüber Doxorubicin bewirkt.

Um diesen wahrscheinlich zytoprotektiven Effekt zu bestimmen, wurde eine mögliche Reduktion der Viabilitätsabnahme nach der Doxorubicinbehandlung durch eine Vorbehandlung mit 25 μM EHT 1864 untersucht.

Ergebnisse

Das Aussäen und die Behandlung der Zellen erfolgte analog zu den Experimenten mit ionisierender Strahlung. Im Anschluss an die Präinkubation mit EHT 1864 wurden die Zellen für 2 h mit Doxorubicinkonzentrationen von 0,1 μM , 1 μM , 7 μM behandelt. Die Ergebnisauswertung erfolgte analog zu den Untersuchungen mit ionisierender Strahlung.

Die Wirkung der Vorbehandlung mit 25 μM EHT 1864 auf das zytotoxische Potential von Doxorubicin beschreibt Abb. 41. Entgegen der Hypothese konnte kein signifikant protektiver Effekt bewiesen werden, obgleich 48 h und 72 h nach der Doxorubicinbehandlung mit einer Konzentration von 7 μM eine leichte Reduktion der Viabilitätsabnahme durch die EHT 1864-Vorbehandlung erkennbar war.

In der Gesamtschau scheint die Präinkubation mit EHT 1864 ähnlich wie nach der Behandlung mit ionisierender Strahlung keinen positiven Effekt auf die Reduktion der Viabilitätsabnahme nach der Doxorubicinbehandlung zu haben.

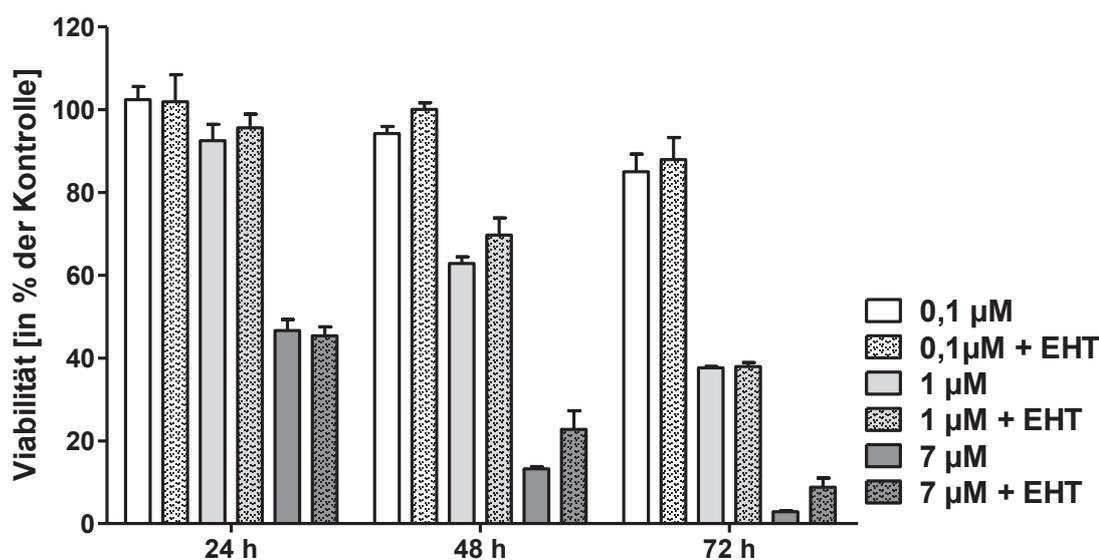


Abb. 41 Modulation der Doxorubicin-induzierten Zytotoxizität durch eine Vorbehandlung mit EHT 1864. Die HaCaT-Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen mit 25 μM EHT 1864 vorbehandelt und nach 4-stündiger Inkubation für 2 h mit verschiedenen Konzentrationen Doxorubicin (0,1 – 7 μM) behandelt. Die Messzeitpunkte (24 – 72 h) entsprechen den Zeiträumen nach der Doxorubicinbehandlung. Normalisiert wurden die Ergebnisse auf die jeweilige Kontrolle (\cong 100 %). Für jede Bedingung wurde der Mittelwert aus 6 Replikaten gebildet. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten.

4.6.2 EHT 1864 hat keinen relevanten Einfluss auf die strahlungsinduzierten Veränderungen der SubG1-Fraktion und des Zellzyklus

Nachdem bereits die Untersuchung der Zellviabilität keinen deutlichen Hinweis auf einen zytoprotektiven Effekt einer Pulsbehandlung mit EHT 1864 lieferte, konnte dieses mittels der durchflusszytometrischen Untersuchung der SubG1-Fraktion und des Zellzyklus bestätigt werden.

Abb. 42 stellt die Induktion der SubG1-Fraktion durch ionisierende Strahlung und die Modulation dieser durch eine Vorbehandlung mit 25 μM EHT 1864 dar. Die Verwendung des Rac1-Inhibitors EHT 1864 führte 48 h nach der Bestrahlung mit 10 Gy und 72 h nach der Bestrahlung mit 3 Gy zu einer Reduktion der SubG1-Fraktion. Bei den anderen Messungen bewirkte EHT 1864 eine Erhöhung des Anteils der Zellen, die sich in der SubG1-Fraktion befanden.

Dieser nachteilige Effekt einer Pulsbehandlung mit 25 μM EHT 1864 bestätigte die Ergebnisse der Zellviabilitätsuntersuchungen, bei denen in der Tendenz ebenfalls eine verstärkte Viabilitätsreduktion durch die Behandlung mit EHT 1864 vor der Bestrahlung zu beobachten war.

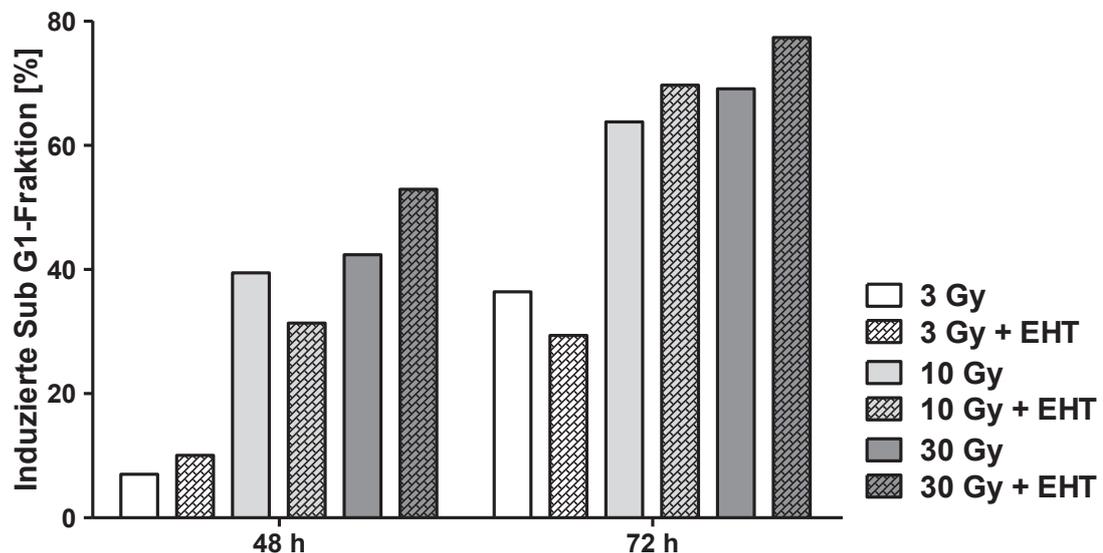


Abb. 42 Modulation der strahlungsinduzierten SubG1-Fraktion durch eine Vorbehandlung mit EHT 1864. Die HaCaT-Zellen wurden optional für 4 h mit 25 μM EHT 1864 vorbehandelt und anschließend bestrahlt. Die Behandlung wurde analog zum Resazurin-Reduktionstest durchgeführt. Die Aufarbeitung und die durchflusszytometrische Untersuchung erfolgten 48 h und 72 h nach der Bestrahlung. Normalisiert wurden die Ergebnisse auf eine vorbehandelte bzw. nicht-vorbehandelte Kontrolle ($\cong 0\%$). Dargestellt ist das Ergebnis eines Experiments (ein Replikat je Bedingung).

Ergebnisse

In Abb. 44 ist die Wirkung von ionisierender Strahlung auf die Zellzyklusverteilung und die Modulation durch eine Vorbehandlung mit EHT 1864 aufgetragen, während Abb. 43 exemplarische Bilder der Durchflusszytometrie zeigt.

Im Gegensatz zu dem HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Lovastatin hatte der spezifische Rac1-Inhibitor EHT 1864 selbst keinen relevanten Einfluss auf die Zellzyklusverteilung. Auch die strahlungsbedingten Effekte auf den Zellzyklus wurden nicht deutlich beeinflusst.

Damit bestätigten sich die Ergebnisse der Untersuchung der Zellviabilität und der SubG1-Fraktion: Eine Vorbehandlung mit 25 μM EHT 1864 bewirkte keinen relevanten zytoprotektiven Effekt gegenüber der strahlungsinduzierten Zellschädigung.

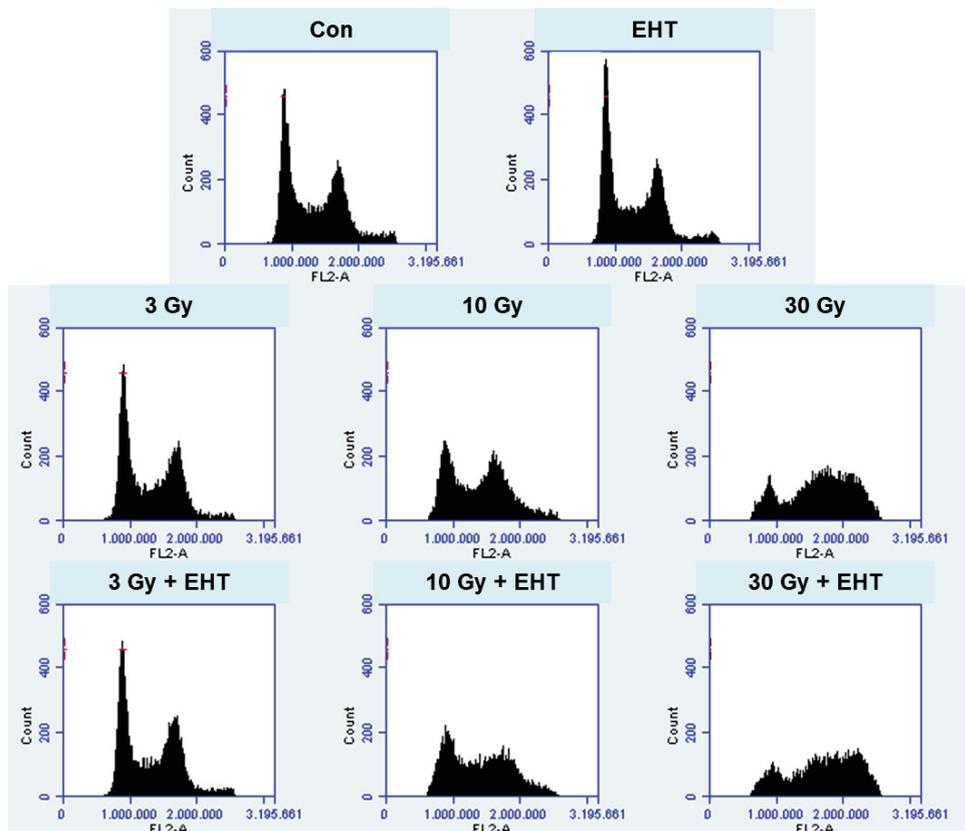


Abb. 43 Exemplarische Bilder der Durchflusszytometrie nach einer Vorbehandlung bestrahlter HaCaT-Zellen mit EHT 1864. Die HaCaT-Zellen wurden optional für 4 h mit 25 μM EHT 1864 vorbehandelt und anschließend bestrahlt. Die Behandlung wurde analog zum Resazurin-Reduktionstest durchgeführt. Aufarbeitung und durchflusszytometrische Untersuchung erfolgten 48 h nach der Bestrahlung.

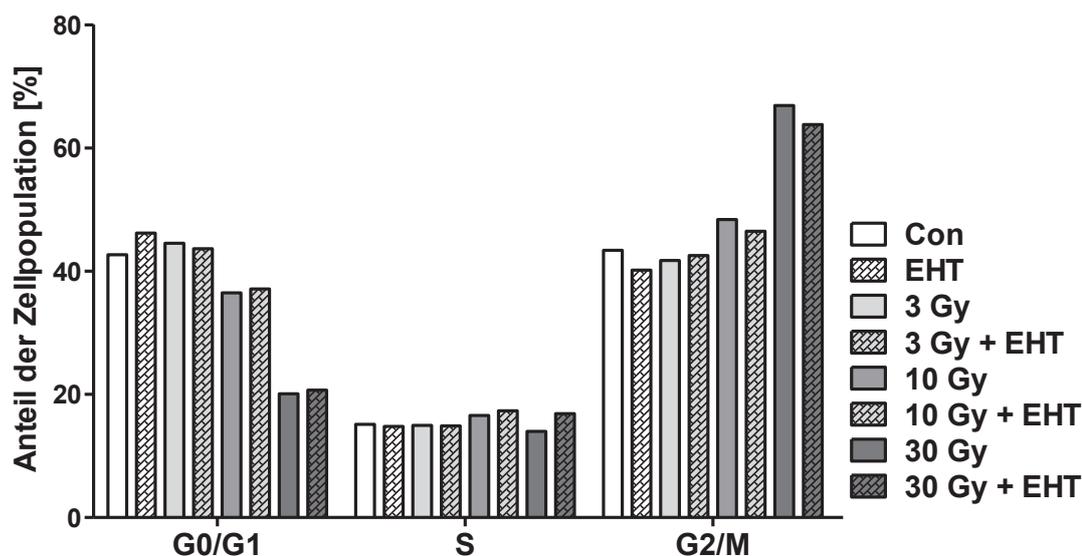


Abb. 44 Modulation der strahlungsinduzierten Effekte auf den Zellzyklus durch eine Vorbehandlung mit EHT 1864. Die HaCaT-Zellen wurden optional für 4 h mit 25 μM EHT 1864 vorbehandelt und anschließend bestrahlt. Die Behandlung wurde analog zum Resazurin-Reduktionstest durchgeführt. Die Aufarbeitung und die durchflusszytometrische Untersuchung erfolgten 48 h nach der Bestrahlung. Dargestellt ist das Ergebnis eines Experiments (ein Replikat je Bedingung).

4.6.3 EHT 1864 hat keinen relevanten Einfluss auf die Doxorubicin-induzierten Veränderungen der SubG1-Fraktion und des Zellzyklus

Ebenso wie bei den Untersuchungen des Einflusses von ionisierender Strahlung zeigte sich auch im Rahmen einer EHT 1864-Behandlung vor der Inkubation der Zellen mit Doxorubicin keine relevante Reduktion der Viabilitätsabnahme im Rahmen des Resazurin-Reduktionstests. Hingegen lieferten die durchflusszytometrischen Analysen der SubG1-Fraktion und des Zellzyklus konträre Ergebnisse.

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der SubG1-Fraktion sind in Abb. 45 aufgetragen. Während bei einer Doxorubicinkonzentration von 0,1 μM sowohl nach 48 h, als auch nach 72 h eine Reduktion der SubG1-Fraktion erkennbar war, zeigte sich bei den anderen Doxorubicinkonzentration insbesondere 48 h nach der Behandlung der gegenteilige Effekt. Es kam durch die Ko-Behandlung zu einer geringfügigen Zunahme der SubG1-Fraktion gegenüber den lediglich mit Doxorubicin inkubierten Zellen. Weitere 24 h später konnte bei einer Doxorubicinkonzentration von 1 μM und 7 μM kein Effekt des EHT 1864 auf die SubG1-Fraktion nachgewiesen werden.

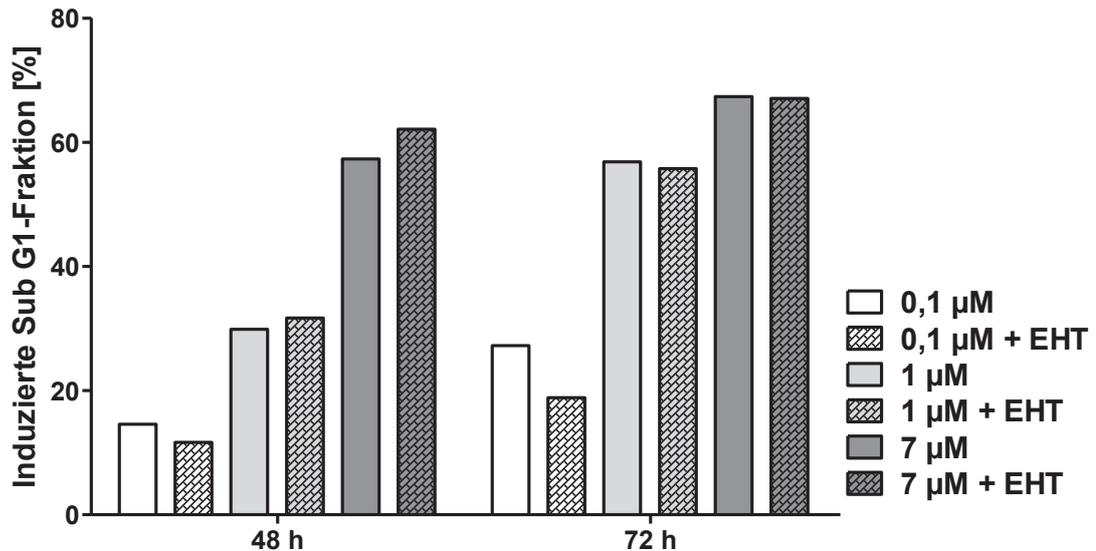


Abb. 45 Modulation der Doxorubicin-induzierten SubG1-Fraktion durch eine Vorbehandlung mit EHT 1864. Die HaCaT-Zellen wurden optional für 4 h mit 25 µM EHT 1864 und anschließend für 2 h mit Doxorubicin inkubiert. Die Behandlung wurde analog zum Resazurin-Reduktionstest durchgeführt. Die Aufarbeitung und durchflusszytometrische Untersuchung erfolgten 48 h und 72 h nach der Doxorubicinbehandlung. Normalisiert wurden die Ergebnisse auf eine vorbehandelte bzw. nicht-vorbehandelte Kontrolle ($\cong 0\%$). Dargestellt ist das normalisierte Ergebnis eines Experiments (ein Replikat je Bedingung).

Abb. 47 beschreibt den Einfluss einer Vorbehandlung mit 25 µM EHT 1864 auf die Zellzyklusverteilung und die Modulation der Doxorubicin-induzierten Effekte, während in Abb. 46 exemplarische Bilder der Durchflusszytometrie dargestellt sind. Im Gegensatz zu dem HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Lovastatin beeinflusste die EHT 1864-Vorbehandlung die Doxorubicin-bedingten Effekte auf die Zellzyklusverteilung nicht in relevanter Weise.

Damit bestätigten sich die Ergebnisse der Untersuchung der Zellviabilität und der SubG1-Fraktion: Eine Vorbehandlung mit 25 µM EHT 1864 hatte keinen relevanten zytoprotektiven Effekt gegenüber der Doxorubicin-induzierten Zellschädigung.

Abschließend ist zu konstatieren, dass entgegen der eingangs aufgestellten Hypothese die Vorbehandlung mit EHT 1864 weder die strahlungs- noch die Doxorubicin-induzierten Effekte auf die Viabilität, die SubG1-Fraktion und den Zellzyklus beeinflusste. Auf der Basis dieser Ergebnisse scheinen die gezeigten genoprotektiven und zytoprotektiven Effekte auf die HaCaT-Zellen von Lovastatin nicht Rac1 vermittelt zu sein. Aus diesem Grund wurde davon abgesehen weitere Untersuchungen mit dem spezifischen Rac1-Inhibitor EHT 1864 durchzuführen.

Ergebnisse

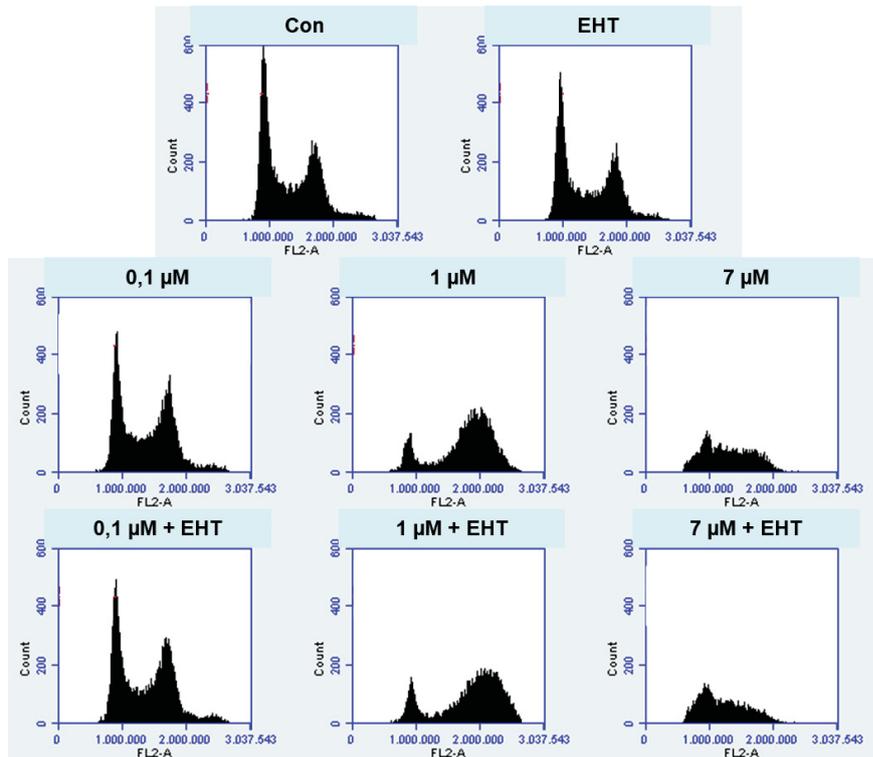


Abb. 46 Exemplarische Bilder der Durchflusszytometrie nach einer Vorbehandlung Doxorubicin-behandelter HaCaT-Zellen mit EHT 1864. Die HaCaT-Zellen wurden optional für 4 h mit 25 µM EHT 1864 vorbehandelt und anschließend für 2 h mit Doxorubicin inkubiert. Die Behandlung wurde analog zum Resazurin-Reduktionstest durchgeführt. Aufarbeitung und durchflusszytometrische Untersuchung erfolgten 48 h nach dem Ende der Behandlung mit Doxorubicin.

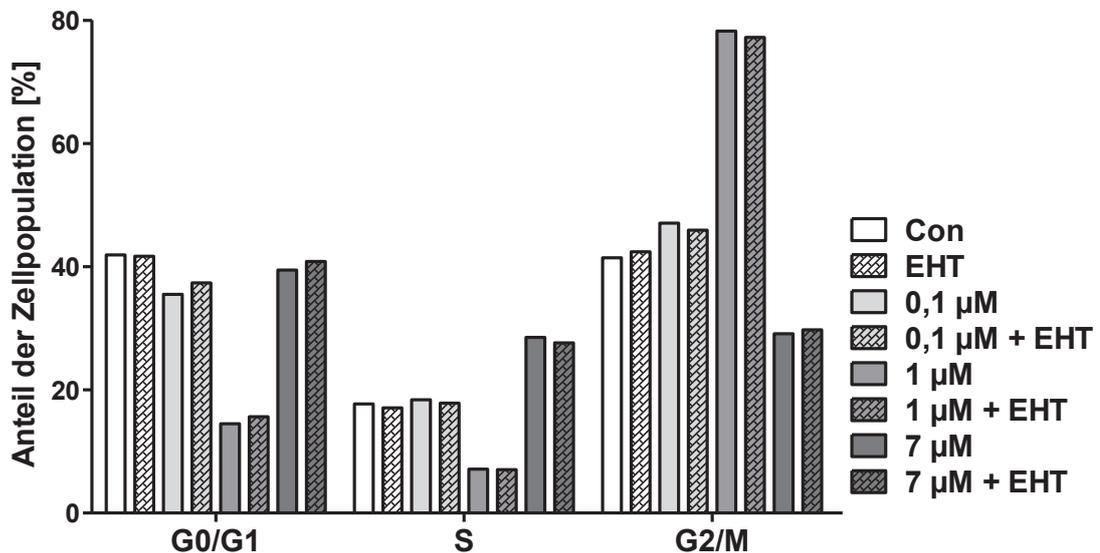


Abb. 47 Modulation der Doxorubicin-induzierten Effekte auf den Zellzyklus durch eine Vorbehandlung mit EHT 1864. Die HaCaT-Zellen wurden optional für 4 h mit 25 µM EHT 1864 und anschließend für 2 h mit Doxorubicin inkubiert. Die Behandlung wurde analog zum Resazurin-Reduktionstest durchgeführt. Die Aufarbeitung und durchflusszytometrische Untersuchung erfolgten 48 h und 72 h nach der Doxorubicinbehandlung. Dargestellt ist das Ergebnis eines Experiments (ein Replikat je Bedingung).

5 Diskussion

Die orale Mukositis ist eine häufige Nebenwirkung bei der Anwendung ionisierender Strahlung im Bereich des Oropharynx zur Therapie eines Plattenepithelkarzinoms. Ebenso wird das Auftreten der Mukositis beschrieben während der Therapie mit dem Chemotherapeutikum Doxorubicin, das Bestandteil verschiedenster Chemotherapieprotokolle, wie zum Beispiel zur Behandlung des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms, ist. Neben stärksten Schmerzen besteht ein erhöhtes Infektionsrisiko, sodass die orale Mukositis als dosislimitierende Nebenwirkung einzustufen ist. Darüber hinaus leiden die betroffenen Patienten in den meisten Fällen unter einer Malnutrition aufgrund der deutlich erschwerten Nahrungsaufnahme. Damit verbunden ist eine weitere Reduktion der Lebensqualität eines ohnehin stark eingeschränkten Patienten.

Somit ist die Protektion der oralen und intestinalen Mukosa ein wichtiger Aspekt in der Tumorthherapie. Neben der Anwendung diverser Mundspüllösungen konnten Erfolge mit der Verwendung des Keratinozytenwachstumsfaktors Palifermin erzielt werden. Hierdurch sind die Keratinozyten in den Fokus der Untersuchung zytoprotektiver Agenzien gegenüber dem schädigenden Einfluss von ionisierender Strahlung und Doxorubicin gerückt. Als *in vitro* Modell für die Experimente wurden daher HaCaT-Keratinozyten ausgewählt.

Lovastatin ist ein Medikament der ersten Wahl zur Therapie der Hypercholesterinämie und wird darüber hinaus zur Sekundärprävention nach kardiovaskulären Ereignissen eingesetzt [130]. Der Wirkungsmechanismus beruht auf einer Hemmung des Mevalonat-Signalweges. Neben der endogenen Cholesterinsynthese dient er der Bereitstellung von Isoprenvorstufen für die C-terminalen Prenylierung der Rho-GTPasen [131]. Diese wiederum sind entscheidende Regulatoren des Zellzyklus, der Apoptose und darüber hinaus in die intrazelluläre Organisation eingebunden.

5.1 Lovastatin wirkt protektiv gegenüber der zytotoxischen Wirkung ionisierender Strahlung

Protektive Effekte von Lovastatin auf das Normalgewebe sind aus vorangegangenen *in vitro* und *in vivo* Studien bekannt. So beschreiben Nübel *et al.* einen protektiven Effekt von Lovastatin auf humane Endothelzellen gegenüber Bestrahlung [90]. Ostrau *et al.* konnten in einem *in vivo* Mausmodell zeigen, dass Lovastatin-behandelte Mäuse bei einer Bestrahlung einen Vorteil gegenüber nicht mit Lovastatin behandelten Mäusen hatten [132]. Für Simvastatin, ein weiterer Vertreter der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, wurde eine positive Beeinflussung der strahlungsinduzierten Enteropathie nachgewiesen [93].

Die zunächst durchgeführte *in vitro* Untersuchung der Viabilität von HaCaT-Zellen mit dem Resazurin-Reduktionstest zeigte für die 24-stündige Vorbehandlung mit Lovastatin nach 48 h eine signifikant geringere Reduktion der Viabilität gegenüber den lediglich bestrahlten Zellen. Der Effekt war bei der Dauerbehandlung mit Lovastatin in geringerer Dosierung erst nach 72 h signifikant. Zum einen ist es möglich, dass es sich grundsätzlich um einen nur transienten zytoprotektiven Statineffekt handelt, zum anderen könnte die zytoprotektive Wirkung bei der Dauerbehandlung aufgrund der geringeren Dosierung des Statins zeitverzögert einsetzen. Nübel *et al.* wiederum beschreiben eine radioprotektive Wirkung für Lovastatin auf humane Endothelzellen für einen Zeitraum von 96 h bei einer Dauerbehandlung und für 72 h bei einer Präinkubation [90]. Es ist anzumerken, dass die dort verwendete Konzentration für die Dauerbehandlung mit Lovastatin bei lediglich 1 μM lag. Diese Ergebnisse sprechen für die These, dass der protektive Effekt in den HaCaT-Keratinocyten aufgrund der geringeren Dosierung zeitverzögert einsetzt. In der Zusammenschau mit den Ergebnissen von Sanli *et al.*, die Lovastatinkonzentrationen zwischen 5 μM und 50 μM verwendeten, ist zu konstatieren, dass die vorgeschaltete Pulsbehandlung mit Lovastatin bei Sensibilisierung von Tumorgewebe gleichzeitig die Viabilitätsabnahme im Normalgewebe reduzierte [84].

Die Viabilität beschreibt im weitesten Sinne einen intakten Zellstoffwechsel. Treten hierbei Defizite auf, kann es sich um verschiedene Mechanismen wie Apoptose, Nekrose, Seneszenz oder auch eine Proliferationshemmung handeln. Die Durchflusszytometrie stellt eine Möglichkeit dar, den Zellzyklus genauer zu untersuchen und die SubG1-Fraktion zu quantifizieren. Die SubG1-Fraktion ist dabei definiert als Menge der Zellen, die keinen

doppelten Chromosomensatz mehr enthalten und umfasst demnach vornehmlich apoptotische aber auch nekrotische Zellen [133].

Im Fokus der Untersuchungen stand insbesondere die mögliche Korrelation der Viabilitätsabnahme mit der gleichzeitigen Zunahme des Anteils der Zellpopulation an der SubG1-Fraktion. Bezüglich des Zellzyklus waren insbesondere Verschiebungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle durch die Bestrahlung und eine mögliche Modulation durch Lovastatin von Interesse. Die Untersuchungen zeigten vor allem nach 48 h eine signifikante Reduktion der SubG1-Fraktion der Lovastatin-vorbehandelten Zellen gegenüber den lediglich bestrahlten Zellen. Nach 72 h trat kein wesentlicher Effekt mehr auf. Die zytoprotektive Wirkung einer Dauerbehandlung mit Lovastatin war insgesamt als deutlich geringer einzustufen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Lovastatinvorbehandlung vor einer Bestrahlung sowohl eine Reduktion der Viabilitätsabnahme als auch eine kleinere SubG1-Fraktion im Vergleich zu den lediglich bestrahlten Zellen bedingte. Wie bereits beschrieben, finden sich in der SubG1-Fraktion vornehmlich apoptotische und nekrotische Zellen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Reduktion der Viabilität nach einer Bestrahlung weniger auf Seneszenz oder veränderter Proliferation als auf der Induktion von Apoptose und Nekrose beruht. Somit scheint Lovastatin die Apoptose bzw. Nekrose bestrahlter Zellen zu reduzieren. Fraglich bleibt allerdings inwiefern die protektiven Effekte der Lovastatinvorbehandlung auf einen Zellzyklusarrest oder gesteigerte Proliferation zurückzuführen sind.

Lovastatin wird im Rahmen experimenteller Zellzyklusuntersuchungen regelhaft angewendet, um eine Zellpopulation, unabhängig davon ob Tumorzellen oder Normalgewebe, in der G₁-Phase zu synchronisieren [134]. Insofern ist ein Zellzyklusarrest als Erklärungsansatz für die zytoprotektiven Lovastatineffekte durchaus denkbar. Dabei ist der zytoprotektive Effekt einer Proliferationshemmung darin begründet, dass die strahlungsinduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen erst im Rahmen der Replikation den Zelltod bedingen. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse des Zellzyklus zeigten jedoch einen leichten G₂-Arrest, den Lovastatin gegenüber der unbehandelten Kontrolle bewirkte. Dies steht nicht grundsätzlich im Widerspruch zur Literatur, denn auch Jakobisiak *et al.* haben Anhaltspunkte für die Induktion eines G₂-Blocks beschrieben [135]. Allerdings stellte auch bei deren Untersuchungen der G₁-Block den Haupteffekt dar.

Durch die Anwendung ionisierender Strahlung arretierten die HaCaT-Keratinocyten insbesondere bei hohen Strahlendosen in der G₂-Phase, während eine Lovastatinvorbehandlung diesen G₂-Arrest reduzierte. Der Zellzyklusarrest in der G₂-Phase durch ionisierende Strahlung scheint ein typisches Phänomen zu sein, denn bereits Muschel *et al.* haben den G₂-Arrest durch ionisierende Strahlung in HeLa-Zellen beobachtet und mit einer gesteigerten *CyclinB*-Expression begründet [136].

Abschließend ist festzustellen, dass die Reduktion der SubG1-Fraktion und damit auch die geringere Viabilitätsabnahme nicht eindeutig auf eine Proliferationshemmung zurückführen ist. Um dies genauer zu evaluieren wurde mit Hilfe der EdU-Inkorporation die S-Phase bzw. die Aktivität der Zellen in der S-Phase als Korrelat zur Zellproliferation untersucht.

5.2 Lovastatin wirkt protektiv gegenüber der zytotoxischen Doxorubicinwirkung

Ebenso wie bei der Therapie mit ionisierender Strahlung gehört die orale Mukositis auch zum Spektrum der unerwünschten Wirkungen des Anthrazyklinderivats Doxorubicin [16, 137, 138]. In der Vergangenheit konnte bereits gezeigt werden, dass Lovastatin unter anderem protektiv auf Kardiomyozyten gegenüber der irreversiblen Schädigung durch Doxorubicin wirkte und die chronische Herzinsuffizienz *in vivo* reduzierte [109]. In einer weiteren *in vivo* Studie war es möglich die Hepatotoxizität herabzusetzen [87]. Neben diesen positiven Effekten in verschiedenen *in vivo* Modellen konnte ebenso mit Hilfe von HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren die zytotoxische Wirkung von Doxorubicin auf humane Endothelzellen *in vitro* reduziert und die DNA-Schadenantwort humaner Sarkomzellen moduliert werden [85, 139].

Bereits die Viabilitätsmessung mit dem Resazurin-Reduktionstest lieferte erste Hinweise auf einen protektiven Lovastatineffekt: Es war bei allen untersuchten Doxorubicinkonzentrationen nach 48 h dosisabhängig eine höhere Viabilität bei den Lovastatin-behandelten Zellen messbar. Fraglich ist ebenso wie bei der protektiven Lovastatinwirkung gegenüber ionisierender Strahlung, ob es sich um einen transienten Effekt handelt und wodurch dieser Effekt bedingt ist.

Eine Hemmung der Proliferation ist ebenso wie eine Steigerung der Proliferation ein möglicher Erklärungsansatz. Die Proliferation ist von eminenter Bedeutung für die

Diskussion

zytotoxische Wirkung von Doxorubicin. Sowohl die DNA-interkalierende Wirkung als auch die Hemmung der Topoisomerase II von Doxorubicin entfalten primär im Rahmen der Replikation und damit letztlich der Zellproliferation ihr zytotoxisches Potential [24, 25].

Die durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse erbrachte hier zwei wichtige Erkenntnisse: Zum einen korrelierte die Reduktion der Viabilitätsabnahme mit der geringeren SubG1-Fraktion bei den Lovastatin-vorbehandelten Zellen gegenüber den lediglich mit Doxorubicin-behandelten Zellen. Zum anderen war kein Zellzyklusblock durch Lovastatin induzierbar, weder durch die alleinige Anwendung, noch in Kombination mit Doxorubicin. Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass eine alleinige, Statin-vermittelte Proliferationshemmung den zytoprotektiven Effekt gegenüber Doxorubicin nicht bedingt.

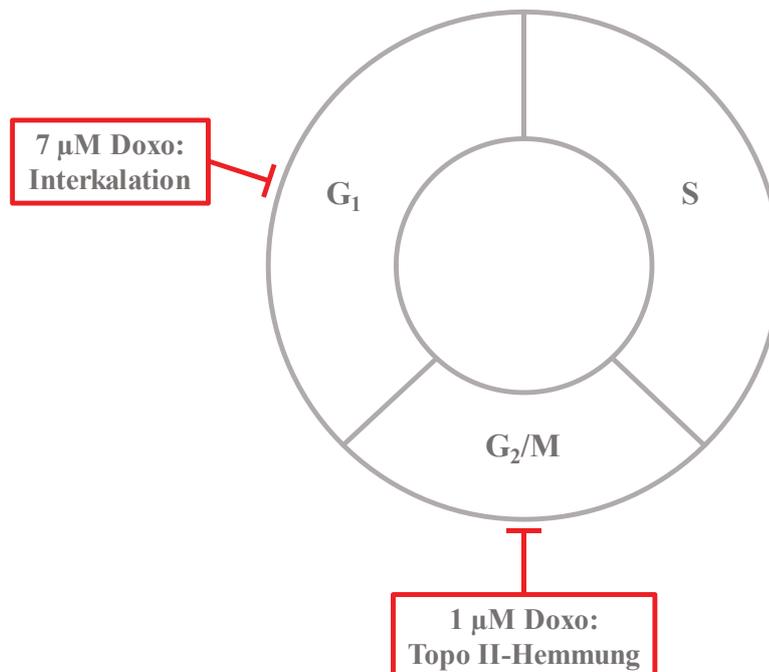


Abb. 48: Konzentrationsabhängige Wirkung von Doxorubicin auf den Zellzyklus der HaCaT-Keratinocyten. Während eine Konzentration von 7 µM Doxorubicin in Folge einer Interkalation in den DNA-Doppelstrang einen G₁-Arrest bedingte, kam es bei einer Doxorubicinkonzentration von 1 µM durch die Hemmung der Topoisomerase II vornehmlich zu einem Arrest in der G₂/M-Phase.

Interessant ist die Feststellung, dass die jeweilige Doxorubicinkonzentration die Art des Zellzyklusblocks bestimmte (Abb. 48): Bei einer Konzentration von 1 µM kam es zum G₂-Arrest, während bei 7 µM ein dezenter G₁-Arrest induziert wurde. Dieser konzentrationsabhängige Einfluss auf die Inhibition des Zellzyklus scheint in

Diskussion

Zusammenhang zu stehen mit den divergenten zytotoxischen Effekten von Doxorubicin bei unterschiedlichen Konzentrationen [25, 28, 31]. In Frage kommen drei potentielle Formen eines zyto- bzw. genotoxischen Effekts: Die Inhibition der Topoisomerase II und die daraus resultierende Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen ist der wohl bedeutendste Mechanismus und scheint insbesondere bei geringeren Konzentrationen eine Rolle zu spielen [25]. Bei höheren Konzentrationen interkaliert Doxorubicin zunehmend in die DNA-Doppelhelix, was die Replikation verhindert [28]. Es ist zu vermuten, dass durch die beiden Mechanismen unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert werden, die über die Arretierung in einer bestimmten Zellzyklusphase entscheiden: Während eine Blockade in der G₁-Phase mit einer verstärkten Expression von p53 und p21 korreliert, ist bei dem G₂-Arrest eine verstärkte Phosphorylierung des *Cyclin B-Cdc2*-Komplexes nachweisbar. [140, 141] Neben diesen beiden Effekten wird das Redoxcycling mit der Entstehung von reaktiven Sauerstoffverbindungen insbesondere als Ursache für die Kardiotoxizität diskutiert [31].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass eine Präinkubation mit Lovastatin zytoprotektiv gegenüber höheren und auch geringeren Doxorubicinkonzentrationen wirkt. Gleichzeitig haben Martirosyan *et al.* eine Sensibilisierung von Ovarialtumorzellen gegenüber Doxorubicin durch eine Behandlung mit Lovastatin mit ähnlicher Konzentration erzielen können [142]. Sie machten hierfür zwei p53-unabhängige Mechanismen verantwortlich: Zum einen die Inhibition des Mevalonatsignalweges und zum anderen eine Sensibilisierung von resistenten Tumorzellen durch die Hemmung eines P-Glykoproteins, das dem Ausschleusen von Substanzen aus der Zelle dient [142].

Fraglich bleibt, welche Bedeutung eine Beeinflussung der Zellzyklusprogression für die zytoprotektiven Effekte des Statins bei den HaCaT-Keratinocyten hat. Auch wenn sich in der Durchflusszytometrie kein Zellzyklusarrest bei der gleichzeitigen Behandlung mit Lovastatin und Doxorubicin zeigte. Um dies zu verifizieren, empfiehlt sich die Untersuchung der S-Phase mittels EdU-Inkorporation.

5.3 Die zytoprotektiven Effekte von Lovastatin beruhen nicht auf einer Proliferationshemmung

Es ist beschrieben, dass Lovastatin die Transition von der G₁- zur S-Phase hemmt und in der Konsequenz die Proliferationsrate senkt [143]. Diese Wirkung scheint unabhängig von der Inhibition der HMG-CoA-Reduktase und nicht durch p53 vermittelt zu sein [144]. Als potentielle Erklärung für die gezeigte zytoprotektive Wirkung in der Viabilitätsmessung der HaCaT-Keratinocyten gegenüber Doxorubicin und ionisierender Strahlung ist (wie bereits beschrieben) eine Beeinflussung der Proliferation denkbar. Eine Proliferationshemmung müsste bestehen, bis die induzierten Schäden repariert sind und im Falle des Doxorubicins das schädigende Agens nicht mehr in wirksamer Konzentration vorliegt, um zytoprotektiv zu wirken und damit die Apoptoserate zu reduzieren. Durch die gesteigerte Induktion der Proliferation würden geschädigte Zellen deutlich schneller ersetzt, die Apoptose bzw. Nekrose jedoch nicht beeinflusst.

Die immunzytochemische Auswertung der EdU-Inkorporation zeigte, dass ionisierende Strahlung eine geringfügige Hemmung der Proliferation bedingte, ebenso wie die Inkubation mit Lovastatin. Da es keinen signifikanten Unterschied zwischen den vorbehandelten, bestrahlten Zellen und den lediglich bestrahlten Zellen gab, ist zu konstatieren, dass die protektive Wirkung einer Lovastatinvorbehandlung nicht auf der Basis einer Proliferationshemmung oder -induktion erfolgte. Dies wurde auch durch die durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen bestätigt, die keine relevanten Unterschiede der Zellzyklusverteilung zwischen Lovastatin-vorbehandelten, bestrahlten Zellen und lediglich bestrahlten Zellen aufzeigten.

Doxorubicin halbierte die Proliferationsrate nahezu gegenüber der unbehandelten Kontrolle, während die Lovastatinbehandlung vor der Inkubation mit Doxorubicin diesen Effekt wieder aufhob. Die Proliferation der Lovastatin-vorbehandelten Zellen war ähnlich hoch wie die Proliferation der unbehandelten Kontrolle. Auch diese Ergebnisse korrelieren mit den durchflusszytometrischen Messungen, in denen Lovastatin den Doxorubicin-induzierten Zellzyklusarrest aufhob. Hinsichtlich der zytoprotektiven Lovastatinwirkung gegenüber Doxorubicin sind somit zwei Erklärungsansätze denkbar: Zum einen kann es sich lediglich um eine gesteigerte Proliferation handeln. Zum anderen ist es möglich, dass die Lovastatinwirkung unabhängig von der Proliferation ist und es sich um genoprotektive und zytoprotektive Effekte handelt. Da Lovastatin alleine die Proliferation gegenüber der

unbehandelten Kontrolle reduzierte, erscheint der letztgenannte Erklärungsansatz wahrscheinlicher.

5.4 Lovastatin beeinflusst die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen

Die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen ist ein Wirkungs- bzw. Schädigungsmechanismus sowohl des Anthrazyklinderivats Doxorubicin als auch der ionisierenden Strahlung. Insofern bietet sie einen möglichen Zielpunkt der zytoprotektiven Wirkung von Lovastatin. Als Surrogatmarker für DNA-Doppelstrangbrüche dienen ko-lokalisierte γ H2AX- und 53BP1-Foci. Die Phosphorylierung des Histons 2AX ist ein lange bekanntes Korrelat der Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen, wobei die Validität der immunzytochemischen Färbung durch die ko-lokalisierte Auswertung von 53BP1-Foci erhöht wird [145, 146].

Zunächst ist festzustellen, dass eine hochdosierte Vorbehandlung mit Lovastatin gegenüber der unbehandelten Kontrolle nicht mehr DNA-Doppelstrangbrüche bewirkte. Neben der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies und der Aktivierung von Rezeptoren der Zelloberfläche ist die Entstehung direkter DNA-Schäden der wichtigste zytotoxische Mechanismus von ionisierender Strahlung [45, 147]. Von größter Bedeutung sind hierbei DNA-Doppelstrangbrüche [148]. Die Vorbehandlung mit Lovastatin konnte die Induktion von DNA-Schäden nicht verhindern. Es war jedoch eine stärkere Reduktion der Foci über den Beobachtungszeitraum von 8 h bei den Lovastatin-behandelten, bestrahlten Zellen gegenüber den bestrahlten Zellen erkennbar. Zu erklären ist dies am ehesten durch eine verbesserte DNA-Schadenantwort und damit einer schnelleren Reparatur, die am ehesten über die Lovastatinwirkung auf die kleinen Rho-GTPasen vermittelt ist. Insbesondere für Rac1, als Vertreter der Rho-GTPasen, konnte neben dem zytosolischen und dem membranständigen Vorkommen auch eine Lokalisation im Zellkern nachgewiesen werden [149, 150]. Im Zellkern bewirkt Rac1 unter anderem eine Regulation der Topoisomerase II, die eine wichtige Rolle für die Replikation sowie Transkription und damit auch für die DNA-Schadenantwort spielt [129].

Dem gegenüber stehen die Beobachtungen von Nübel *et al.* bei der Untersuchung des zytoprotektiven Effekts von Lovastatin auf HUVEC-Zellen gegenüber ionisierender Strahlung: Hier gab es keinen Zusammenhang mit der Induktion und Reparatur von DNA-

Doppelstrangbrüchen [90]. Fraglich ist, inwiefern die kürzere Beobachtungsdauer von 3,5 h das Fehlen eines Effektes erklärt. Es ist durchaus denkbar, dass nach einer längeren Zeitspanne auch bei den HUVEC-Zellen eine beschleunigte Reparatur der Doppelstrangbrüche vorliegt. Unterstützt wird diese These durch Untersuchungen der DNA-Reparaturmechanismen von glatten Gefäßmuskelzellen bei der Anwendung von Atovarstatin [91].

Wie bereits eingangs erwähnt, zählt die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen zu den typischen zellschädigenden Mechanismen von Doxorubicin [25]. Die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen wird in Zusammenhang gebracht mit einer Hemmung der Topoisomerase II, wobei schon gezeigt wurde, dass es sich hierbei um einen wichtigen Faktor für die Kardiotoxizität handelt [151].

Die Untersuchungen zeigten, dass Doxorubicin auch in den HaCaT-Keratinocyten DNA-Doppelstrangbrüche induzierte. Interessant ist die weitere Zunahme der Foci um den Faktor 1,5 in den folgenden Stunden nach Beendigung der Inkubation mit Doxorubicin. Eine mögliche Erklärung ist, dass in den Zellen noch zytotoxische Doxorubicinkonzentrationen vorlagen. Durch die Vorbehandlung mit Lovastatin konnte nicht nur die Anzahl der Doppelstrangbrüche nach 8 h reduziert, sondern auch deren initiale Entstehung gehemmt werden. Damit ist festzustellen, dass Lovastatin in zwei Gesichtspunkten die HaCaT-Keratinocyten protektiv beeinflusst: Zum einen verhindert es die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und zum anderen verbessert es die Reparatur gerade entstandener DNA-Doppelstrangbrüche.

Ersteres lässt sich in Zusammenhang bringen mit der Beeinflussung der Topoisomerase II. Sandrock *et al.* beschreiben eine Regulation der Topoisomerase II durch die Bindung der kleinen Rho-GTPase Rac1 [129]. Insofern ist es außerdem denkbar, dass die Vorbehandlung mit Lovastatin eine Rac1-Hemmung und damit eine geringere Aktivität der Topoisomerase II bedingt [86, 152]. Grundsätzlich besteht die Möglichkeit, dass Lovastatin den Import und Export von Doxorubicin in die Zelle herein bzw. aus ihr heraus beeinflusst und damit die intrazelluläre Doxorubicinkonzentration reduziert. Dies konnte jedoch durch eine durchflusszytometrische Messung der intrazellulären Doxorubicinkonzentration ausgeschlossen werden [153]. Eine weitere Beobachtung war die Größenzunahme der Foci, wenn die Keratinocyten mit Lovastatin und Doxorubicin parallel behandelt wurden. Weder Lovastatin, noch Doxorubicin alleine bedingten diesen Effekt, sodass er auf das zeitparallele Einwirken der beiden Substanzen zurückzuführen

sein muss. Neben der Möglichkeit, dass es sich um ein Artefakt handelt, ist es ebenso möglich, dass verstärkt H2AX phosphoryliert und 53BP1 rekrutiert wird. Jedoch konnte mittels Western Blot gezeigt werden, dass eine Vorbehandlung der HaCaT-Zellen mit Lovastatin vor der Doxorubicininkubation die Phosphorylierung von H2AX hemmt im Vergleich zu einer alleine mit Doxorubicin-behandelten Kontrolle [153].

Abschließend ist damit festzustellen, dass die Vorbehandlung mit einer hohen Lovastatinkonzentration von 30 μM die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen in HaCaT-Keratinocyten beschleunigt. Dieser Effekt ist unabhängig davon, ob die DNA-Doppelstrangbrüche durch ionisierende Strahlung oder Doxorubicin induziert wurden. Damit ist eine potentielle Erklärung für die bereits gezeigte zytoprotektive Wirkung von Lovastatin gegeben, obgleich (wie beschrieben) in der Vergangenheit in verschiedenen anderen *in vitro*-Modellen eben diese Wirkung ausgeschlossen wurde.

5.5 Rac1 als ein möglicher Zielpunkt der zytoprotektiven Wirkung von Lovastatin

Nachdem die zytoprotektive Wirkung von Lovastatin auf die schädigenden Einflüsse von ionisierender Strahlung und Doxorubicin gezeigt wurde, stellt sich die Frage nach möglichen molekularen Mechanismen. Die Untersuchung der Stressantwort von Normalgewebe auf ionisierende Strahlung zeigte, dass ein Apoptose-bedingender Signalweg Rac1 vermittelt ist [154]. Ebenso ist bekannt, dass Rac1 von entscheidender Bedeutung für die Funktion der Topoisomerase II ist [129]. Dabei werden zwei Isoformen unterschieden: Topoisomerase II α und Topoisomerase II β . Während die Expression der alpha-Unterform, (Regulation des Zellwachstums) zellzyklusabhängig reguliert wird und in der der G_2/M -Phase maximal ist, wird die beta-Unterform (Regulation des Zellüberlebens) während des gesamten Zellzyklus expremiert [155]. Insbesondere die verstärkte Expression der Topoisomerase II α induziert die Tumorentstehung [156]. In Korrelation hierzu konnte gezeigt werden, dass therapierefraktäre Tumore und die Entstehung von Zweittumoren häufig durch eine Resistenz gegenüber Substanzen bedingt sind, die als Inhibitoren der Topoisomerase II α wirken [157, 158].

Um zu untersuchen, ob die Hemmung von Rac1 durch Lovastatin entscheidend für dessen Wirkung ist, wurde dieses durch einen spezifischen Inhibitor ausgeschaltet. Als spezifische Rac1-Inhibitoren sind NSC 23766 [159] und EHT 1864 [160] verfügbar. Wartlick *et al.*

fürten eine vergleichende Analyse zur Wirksamkeit der beiden Inhibitoren in einem HepG2 *in vitro* Modell durch und beschreiben für EHT 1864 das größere inhibitorische Potential. Aus diesem Grund wurde es auch hier für die Untersuchungen an den HaCaT-Keratinocyten eingesetzt.

EHT 1864 findet zumeist Anwendung im Rahmen einer 1-stündigen Präinkubation mit einer Konzentration von 10 μM [108, 161]. Für die HaCaT-Keratinocyten stellten sich 25 μM für eine 4-stündige Inkubation als praktikabel heraus, da hier nur ein leichter zytotoxischer Effekt zu beobachten war. Eine Dauerbehandlung kam auch für die HaCaT-Keratinocyten nicht in Frage, da sich die Toxizität mit längerer Wirkdauer potenzierte.

Einige Veröffentlichungen zeigen, dass eine spezifische Hemmung von Rac1 zytoprotektiv gegenüber Anthrazyklinen wirkt bzw. die toxische Doxorubicinwirkung Rac1 vermittelt ist [86, 162]. Gleichzeitig ist dies gegenüber ionisierender Strahlung nur wenig untersucht [86, 163]. Die Tatsache, dass Rac1 mit seinen vielfältigen Regulationsfunktionen unter anderem in Apoptosesignalwege involviert ist, lässt vermuten, dass es potentiell vor den Folgen ionisierender Strahlung schützen kann [154, 164]. Für die HaCaT-Keratinocyten musste jedoch festgestellt werden, dass es keinen protektiven, sondern eher einen additiv zytotoxischen Effekt gegenüber ionisierender Strahlung gab. Gekennzeichnet war dies durch eine reduzierte Viabilität bei korrelierender Zunahme der SubG1-Fraktion der zunächst vorbehandelten und dann bestrahlten Zellen gegenüber den lediglich bestrahlten Zellen. Im Weiteren war zu beobachten, dass EHT 1864 einen geringfügigen G₁-Arrest in den HaCaT-Keratinocyten bedingte. Vor allem in Hinblick darauf, dass die Inkubationsdauer mit 4 h und die Konzentration mit 25 μM deutlich höher waren als in verschiedenen anderen Studien, kann dies als mögliche Ursache für den Zellzyklusarrest angesehen werden [108, 161].

Während für die zytotoxische Wirkung ionisierender Strahlung die Bedeutung von Rac1 fraglich ist, ist diese für Doxorubicin bereits in der Vergangenheit durch andere Autoren beschrieben worden. Die Lovastatin bedingte Rac1-Inhibition bietet einen wirkungsvollen Schutz gegenüber der Anthrazyklin-induzierten Kardiotoxizität [86]. Das Untersuchungsergebnis von Hülsenbeck *et al.* bietet hierfür einen möglichen Erklärungsansatz: Demnach unterbindet die Inhibition von Rac1 die Ausbildung des *Cleavable Complex* und damit wird die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen weitestgehend verhindert [152]. Hingegen scheint für den radioprotektiven Effekt der Statine weniger Rac1, als das kleine G-Protein Rho verantwortlich zu sein. Damit

verbunden ist die Inhibition der Rho/NF κ B-, sowie der Rho/ROCK-Signalkaskade. [99] Doxorubicin wirkt insbesondere in geringen Konzentrationen ($< 1 \mu\text{M}$) als Topoisomerase II-Inhibitor, welche wiederum durch Rac1 reguliert wird [17]. Auch für die HaCaT-Keratinocyten konnte gezeigt werden, dass Rac1 eine entscheidende Funktion für die Wirkung von Lovastatin hat. Zunächst führte die Präinkubation mit EHT 1864 zu einer geringen Steigerung der Viabilität gegenüber den lediglich Doxorubicin-behandelten Zellen. Der Effekt setzte verzögert ein und nahm im Zeitverlauf weiter zu. Auffällig war, dass die Reduktion der Viabilitätsabnahme durch EHT 1864 insbesondere bei den verhältnismäßig hohen Doxorubicinkonzentrationen stattfand. Zu erwarten war eigentlich ein Effekt bei Doxorubicinkonzentrationen $< 1 \mu\text{M}$, da bei einer höheren Dosis die Interkalation in den DNA-Doppelstrang im Vordergrund steht [28, 165]. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse des Zellzyklus und die Bestimmung der SubG1-Fraktion entsprachen hingegen den Ergebnissen aus der Literatur: Bei einer geringen Doxorubicinkonzentration kommt es durch EHT 1864 zu einer deutlichen Reduktion der SubG1-Fraktion. Hülsenbeck *et al.* beschreiben, dass die Hemmung von Rac1 die Bildung des Topoisomerase II-DNA-Komplexes und damit die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen verhindert [152].

Letztlich führen die irreparablen DNA-Schäden zur Apoptose oder Nekrose, die wiederum in der SubG1-Fraktion widerspiegelt wird. Zur Verifizierung, ob bei den HaCaT-Keratinocyten die Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch die Inhibition von Rac1 bedingt ist, empfiehlt sich in zukünftigen Experimenten die Untersuchung mittels immunzytochemischer Färbung von phosphoryliertem H2AX.

5.6 Lovastatin wirkt protektiv gegenüber ionisierender Strahlung durch die Beeinflussung zentraler Signalkaskaden

Der bedeutendste zytotoxische Mechanismus ionisierender Strahlung ist die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen. Diese geschieht zum einen direkt durch Ionisation der DNA und zum anderen indirekt durch die entstehenden freien Radikale bzw. reaktive Sauerstoffspezies. Zwar wird ein Großteil der Schäden mittels nicht-homologer Endverknüpfung oder homologer Rekombination repariert, aber dennoch kommt es zur Akkumulation von Strangbrüchen und chromosomalen Aberrationen. Als Folge sind Zellzyklusarrest und Zelltod zu beobachten. [166]

Die Untersuchung der Entstehung und Reparatur von Doppelstrangbrüchen zeigte bereits, dass Lovastatin die Induktion durch ionisierende Strahlung nicht verhinderte, aber die Reparatur eben dieser beschleunigte. Außerdem war bei den durchflusszytometrischen Analysen eine Verringerung des strahlungsinduzierten Zellzyklusarrests in der G₂-Phase durch Lovastatin zu beobachten. Die Inkubation der HaCaT-Keratinocyten mit Lovastatin hatte in der durchflusszytometrischen Analyse einen leichten G₂-Arrest bedingt. Während Keyomarsi *et al.* Lovastatin angewendet haben, um verschiedene Zelltypen in der G₁-Phase zu synchronisieren, sind durch Jakobisiak *et al.* zuvor die zellzyklusspezifischen Effekte von Lovastatin untersucht worden [134, 135]. Hier wurde auch ein G₂-Arrest beobachtet, wenn auch bei dem geringeren Anteil der Zellpopulation [135].

In der Zusammenschau sind daher Signalkaskaden der DNA-Schadenantwort und -reparatur sowie der Zellzykluskontrolle als mögliche Zielpunkte der protektiven Wirkung von Lovastatin gegenüber ionisierender Bestrahlung zu sehen. Darüber hinaus wurden außerdem Marker der Apoptose und der zellulären Stressantwort analysiert.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse zeigten eine verstärkte Expression von Ccna1, Ccne1 und Cdkn1, jeweils kodierend für ein Zyklin, durch die Behandlung mit Lovastatin gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Hierdurch bedingt wird die Zellzyklusprogression aktiviert, was letztlich mit dem kaum beobachtbaren Zellzyklusarrest durch Lovastatin in der durchflusszytometrischen Analyse korreliert. Eine weitere Funktion von Ccna1 ist die Regulation der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch NHEJ und HR [167]. Hier lässt sich ein Zusammenhang mit der Sensibilität gegenüber ionisierender Strahlung herstellen, zumal Ccna1 defiziente Osteoprogenitorzellen und Fibroblasten (MEF) eine deutlich höhere Strahlensensibilität aufweisen als der Wildtyp. [167] Insofern scheint die verstärkte Expression von Ccna1 und die damit verbundene Zellzyklusprogression ein möglicher Aspekt der zytoprotektiven Wirkung von Lovastatin gegenüber ionisierender Strahlung zu sein.

Neben den Zyklinen sind Checkpoint-Kinasen entscheidend in die Regulation des Zellzyklus eingebunden. Eine zentrale Funktion hat hier Chek2, dessen Phosphorylierung durch die strahlungsbedingte Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch ATM gesteigert wird [168]. In der Folge ist sowohl ein p53-vermittelter G₁-Arrest, als auch ein G₂-Arrest durch die Inhibition von Cdc25 möglich [169, 170]. Außerdem kann Chek2 durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors E2F1 indirekt die Einleitung der Apoptose bedingen [169]. Die vielfach beschriebene Phosphorylierung von Chek2 in der Folge von

strahlungsbedingten Doppelstrangbrüchen ist auch in den HaCaT-Keratinocyten zu beobachten [169-171]. Dies ist eine mögliche Erklärung für den G₂-Arrest der bestrahlten Zellen gegenüber der unbehandelten Kontrolle in der durchflusszytometrischen Zellzyklusanalyse. Die Präinkubation mit Lovastatin bedingte eine verminderte Expression gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Hier ist ein Zusammenhang zu sehen mit der reduzierten ATM-Aktivierung, die Mahmoudi *et al.* in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) beschrieben haben [91]. Unter der Ko-Behandlung mit Lovastatin und ionisierender Strahlung ist die Chek2-Expression nahezu auf dem Niveau der unbehandelten Kontrolle. Korrelierend zu den Ergebnissen von Mahmoudi *et al.* zeigten sich auch in den HaCaT-Keratinocyten eine verbesserte Reparatur der Doppelstrangbrüche, sowie eine geringere Viabilitätsreduktion nach einer Präinkubation mit dem HMG-CoA-Inhibitor. Dies ist unter anderem durch dessen Einfluss auf die Chek2-vermittelte DNA-Schadenantwort zu erklären.

Neben der Regulation der Chek2-Expression erscheint die Beeinflussung der Trp63-Expression durch Lovastatin und ionisierende Strahlung als Erklärungsansatz für die Einflussnahme auf den Zellzyklus als geeignet. Trp63 kodiert durch unterschiedliches *Splicing* für eine Vielzahl von p63-Varianten, die der p53-Familie zugeordnet sind [91]. Während die Trp63-vermittelte Zellzyklusregulation indirekt und über eine Vielzahl von Genen, zu denen u.a. c-Jun und Fos als Vertreter des AP1-Komplexes gehören, durchgeführt wird, löst die p53-Kaskade den programmierten Zelltod aus [172, 173]. Die Untersuchungen an den HaCaT-Keratinocyten zeigten, dass die Anwendung ionisierender Strahlung eine deutliche Herunterregulation von Trp63 gegenüber der unbehandelten Kontrolle bedingte. Es muss davon ausgegangen werden, dass der p63-Level neben der geringeren Expression durch verstärkte Degradation über das Ubiquitininsystem weiter reduziert wird [174]. Wurden die HaCaT-Keratinocyten jedoch mit Lovastatin vorbehandelt, entsprach die Expression von Trp63 nach der Bestrahlung in etwa der Kontrolle. Damit ist ein weiterer Erklärungsansatz für die Reduktion des strahlungsinduzierten Zellzyklusblocks und der reduzierten Viabilitätsabnahme durch Lovastatin gegeben.

Wie zu erwarten, bedingte ionisierende Strahlung eine gesteigerte Expression von NOS3, das als Apoptose- und Stressmarker Verwendung fand. Die endotheliale NO-Synthase wird kodiert durch NOS3. Sie liegt konstitutiv intrazellulär vor und hat entgegen der induzierbaren NO-Synthase eine geringere Translationsrate [175]. Die Bestrahlung der HaCaT-Keratinocyten löste eine deutliche Expressionssteigerung von NOS3 aus. Dies

korreliert mit den Ergebnissen von Liu *et al.*, die eine NOS3 Induktion durch oxidativen Stress ausgelöst durch UVB-Strahlung beobachtet haben [176]. Die Regulation der eNOS unterliegt vielfältigen intrazellulären Regulationsmechanismen, wie der Calciumkonzentration und dem AKT-Signalweg [177]. Park *et al.* beschreiben die Aktivierung des AKT-Signalweges durch ionisierende Strahlung, sodass neben einer verstärkten Proteinexpression auch eine vermehrte Aktivität der konstitutiv vorliegenden eNOS bedingt sein kann [178]. Lovastatin reguliert ebenfalls der AKT-/eNOS-Signalweg, sowie die Gentranskription von NOS3 [179]. Begründet ist dies in der Inhibition des kleinen G-Proteins Rho durch Lovastatin, wodurch die inhibitorische Wirkung auf die NOS3-Expression aufgehoben wird [180]. Demnach wäre zu erwarten gewesen, dass die Inkubation der HaCaT-Keratinocyten mit Lovastatin zu einer gesteigerten Expression von NOS3 gegenüber der Kontrolle führt. Dies trifft jedoch nicht zu, vielmehr kam es zu einer Herunterregulation. Durch die Präinkubation mit Lovastatin vor der Bestrahlung wurde NOS3 ebenfalls geringer exprimiert.

Als weiterer Stressmarker wurde Timp-2 verwendet. Es kodiert für einen Inhibitor der Metallopeptidase 2 (MMP 2). Das Gleichgewicht zwischen Metallopeptidase und dem spezifischen Inhibitor spielt eine wichtige Rolle für die Homöostase der extrazellulären Matrix, sodass ein Ungleichgewicht Pathologien bedingen kann [181]. Eine verstärkte Timp-2 Expression ist beschrieben unter Bedingungen der Inflammation, der chronisch degenerativen Erkrankungen, sowie der Tumordinvasion und soll diese reduzieren [182]. Im Fall der HaCaT-Keratinocyten ist die beobachtete Hochregulation von Timp-2 durch ionisierende Strahlung durchaus als Konsequenz einer Inflammationsreaktion zu erklären. Dem gegenüber stehen die Beobachtungen von Araya *et al.*, die keine strahlungsbedingte Hochregulation von Timp-2 in humanen bronchialen Epithelzellen (NHBE), wohl aber von der zugehörigen Metallopeptidase 2 nachweisen konnten [183]. Ebenso zeigte sich bei *in vivo* Experimenten in Ratten kein veränderter Timp-2 Level, wohl aber ein erhöhter MMP 2-Level in Folge einer singulären, totalen zerebralen oder abdominalen Bestrahlung [184, 185]. Korrelierend mit den Ergebnissen von Luan *et al.* führte die Inkubation der HaCaT-Keratinocyten mit Lovastatin zu keiner veränderten Timp-2 Expression im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle [186]. An dieser Stelle wäre auch eine Hochregulation denkbar gewesen. Charvat *et al.* haben für Ras-transfizierte HaCaT-Keratinocyten eine verstärkte Zellmigration in Folge einer Herunterregulation von Timp-2 gezeigt. Das kleine G-Protein Ras wird durch den HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Lovastatin jedoch gehemmt, sodass dessen inhibierende Wirkung auf Timp-2 entfallen

würde. Letztlich wird Timp-2 nur bedingt durch Ras expremiert und liegt zum Teil konstitutiv vor [187]. Gleichzeitig wirkt Lovastatin unspezifisch auf alle kleinen G-Proteine, sodass der Einfluss auf Ras noch zu klären bleibt. Bei der Ko-Behandlung der HaCaT-Keratinocyten mit Lovastatin und ionisierender Strahlung war die Timp-2-Expression gegenüber der unbehandelten Kontrolle nicht verändert, während die Bestrahlung alleine eine verstärkte Expression bewirkte. Insofern ist zu vermuten, dass Lovastatin die strahlungsinduzierte Entzündungsreaktion reduzierte.

Im Weiteren zeigte sich bei den Versuchen mit den HaCaT-Keratinocyten als Zeichen der Inflammation bedingt durch ionisierende Strahlung und Lovastatin eine Hochregulation von Il-6 in dem 24-stündigen Intervall nach der Bestrahlung. Das Interleukin-6 ist ein früher Marker der akuten Phase Reaktion und findet auch als solcher speziell in der Pädiatrie eine klinische Anwendung [188, 189]. Einen zusätzlicher Hinweis auf die induzierte Entzündungsreaktion durch die Bestrahlung der Keratinocyten gibt das vermehrte Auftreten von Cxcr4 [190]. Neben diesen direkten Markern für eine Entzündungsreaktion ist eine Zunahme von Cyp1A1 als indirekter Entzündungsmarker in Zusammenhang zu bringen mit dem entstehenden oxidativen Stress durch ionisierende Strahlung. Für den sekundär entstehenden Schaden durch Strahlung sind freie Radikale, der resultierende oxidative Stress und insbesondere der intrazelluläre Abbau der Radikale (u.a. durch Cyp1A1-regulierte Cytochrom p450-Enzyme) von Bedeutung [45].

Abschließend ist zu konstatieren, dass die beobachteten zytoprotektiven Effekte von Lovastatin gegenüber ionisierender Strahlung auf der Modulation verschiedener Zykline, Checkpoint-Kinasen und von Trp63 beruht. Hierdurch wird ein geringerer Zellzyklusblock bedingt. Fraglich bleibt, welche Rolle die Modulation von Timp-2 und damit die Beeinflussung der Extrazellulärmatrix für die zytoprotektive Statinwirkung hat, zumal auch keine aussagekräftigen Daten in der Literatur zu finden sind.

5.7 Lovastatin ist ein geeigneter Radioprotektor

Die Entwicklung eines potenten Radioprotektors ist für die medizinische Anwendung von besonderer Bedeutung, da Therapien mit ionisierender Strahlung eine zentrale Funktion in einer Vielzahl von Tumortherapieregimen haben. Es ist zunächst zu differenzieren zwischen Radioprotektoren und Radiomitigatoren: Erstere wirken protektiv gegenüber

ionisierender Strahlung bei einer Applikation vor der Bestrahlung. Letztere müssen zwischen Bestrahlung und dem Auftreten potentieller Nebenwirkungen appliziert werden. Entscheidende Kriterien, die einen guten Radioprotektor definieren, sind insbesondere die einfache Anwendung (z.B. einmal tägliche, orale Applikation), die ständige Verfügbarkeit, sowie eine preisgünstige Bereitstellung und geringe Nebenwirkungen. [49]

In den durchgeführten Experimenten stellte sich heraus, dass die Vorbehandlung mit Lovastatin die HaCaT-Keratinocyten effektiv vor der zyto- und genotoxischen Wirkung der ionisierenden Strahlung schützte. Es korrelierte eine reduzierte Viabilitätsabnahme mit einer kleineren SubG1-Fraktion und einem geringeren Zellzyklusblock in der G2-Phase bei einer Behandlung der HaCaT-Keratinocyten mit Lovastatin vor der Einwirkung ionisierender Strahlung. Diese Effekte beruhten nicht auf einer Proliferationshemmung, sondern am ehesten auf einer verbesserten DNA-Schadenantwort, wie mittels einer Untersuchung der EdU-Inkorporation, der Färbung von ko-lokalisierten 53BP1 und γ H2AX-Foci, sowie Western-Blot-Analysen gezeigt wurde [153]. In der Zusammenschau der Ergebnisse zeigten sich deutliche radioprotektive Effekte von Lovastatin.

Zu bedenken ist jedoch, dass die angewendete Wirkdosis von 30 μ M Lovastatin deutlich höher ist als bei einer gewöhnlichen Lovastatintherapie mit dem primären Ziel einer Senkung des LDL-Cholesterins. Hierbei werden im Mittel Serumkonzentrationen von etwa 7 ng/ml erreicht [191]. Zahlreiche Untersuchungen in der Vergangenheit konnten jedoch darlegen, dass auch bei einer 30-fachen Dosiserhöhung keine signifikante Steigerung der Komplikationsrate hinsichtlich der unerwünschten Wirkungen zu erwarten ist. Dies gilt auch für die Rhabdomyolyse als potentiell lebensbedrohliche Nebenwirkung. [192-194]

Grundsätzlich besteht bei einem Radioprotektor das Problem, dass nicht nur das Normalgewebe, sondern auch das Tumorgewebe gegenüber der ionisierenden Strahlung weniger sensibel reagiert. Dies ist bei Lovastatin nicht der Fall: Metaanalysen haben gezeigt, dass mindestens ein neutraler Effekt auf das Wachstum und die Metastasierung maligner Tumore besteht und die Mortalität herabgesetzt wird [81, 82]. Eine mögliche Erklärung ist, dass insbesondere schnell wachsende Tumore häufig hypovaskularisiert sind, sodass im Tumorgewebe keine ausreichende Wirkstoffkonzentration erreicht wird [49]. Für spezielle Krebserkrankungen wie z.B. das Bronchialkarzinom und einige Lymphome konnte eine Sensibilisierung des Tumorgewebes gegenüber ionisierender Strahlung durch Lovastatin bewirkt werden [84, 195].

Diskussion

Bezüglich der protektiven Wirkung auf das Normalgewebe gegenüber ionisierender Strahlung konnte bereits ein schützender Effekt von Lova- und Simvastatin auf Lungengewebe, sowie von Pravastatin auf die Darmschleimhaut im Rahmen von in vivo Experimenten gezeigt werden [92, 163, 196, 197].

In Anbetracht dieser vielversprechenden Untersuchungen mit Statinen stellt Lovastatin einen potentiellen neuen Radioprotektor dar, dessen Anwendbarkeit zukünftig in klinischen Studien zu untersuchen ist.

6 Literaturverzeichnis

- [1] R. Luengo-Fernandez, J. Leal, A. Gray, and R. Sullivan, "Economic burden of cancer across the European Union: a population-based cost analysis," *Lancet Oncol.*, vol. 14, no. 12, pp. 1165–1174, Nov. 2013.
- [2] J. L. Ambrus, C. M. Ambrus, I. B. Mink, and J. W. Pickren, "Causes of death in cancer patients," *J. Med.*, vol. 6, no. 1, pp. 61–64, 1975.
- [3] S. Dreizen, G. P. Bodey, and V. Rodriguez, "Oral complications of cancer chemotherapy," *Postgrad. Med.*, vol. 58, no. 2, pp. 75–82, Aug. 1975.
- [4] S. T. Sonis *et al.*, "Oral mucositis and the clinical and economic outcomes of hematopoietic stem-cell transplantation," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 19, no. 8, pp. 2201–2205, Apr. 2001.
- [5] N. Treister and S. Sonis, "Mucositis: biology and management," *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, vol. 15, no. 2, pp. 123–129, Apr. 2007.
- [6] C. E. Canman and M. B. Kastan, "Signal transduction. Three paths to stress relief," *Nature*, vol. 384, no. 6606, pp. 213–214, Nov. 1996.
- [7] S. F. Lindquist, A. J. Hickey, and J. B. Drane, "Effect of oral hygiene on stomatitis in patients receiving cancer chemotherapy," *J. Prosthet. Dent.*, vol. 40, no. 3, pp. 312–314, Sep. 1978.
- [8] N. Blijlevens and S. Sonis, "Palifermin (recombinant keratinocyte growth factor-1): a pleiotropic growth factor with multiple biological activities in preventing chemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis," *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO*, vol. 18, no. 5, pp. 817–826, May 2007.
- [9] C. L. Farrell *et al.*, "The effects of keratinocyte growth factor in preclinical models of mucositis," *Cell Prolif.*, vol. 35 Suppl 1, pp. 78–85, Aug. 2002.
- [10] M. Takeoka, W. F. Ward, H. Pollack, D. W. Kamp, and R. J. Panos, "KGF facilitates repair of radiation-induced DNA damage in alveolar epithelial cells," *Am. J. Physiol.*, vol. 272, no. 6 Pt 1, pp. L1174–1180, Jun. 1997.
- [11] B. E. Wildhaber, H. Yang, and D. H. Teitelbaum, "Keratinocyte growth factor decreases total parenteral nutrition-induced apoptosis in mouse intestinal epithelium via Bcl-2," *J. Pediatr. Surg.*, vol. 38, no. 1, pp. 92–96; discussion 92–96, Jan. 2003.
- [12] P. Zia-Amirhosseini *et al.*, "Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety assessment of palifermin (rHuKGF) in healthy volunteers," *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 79, no. 6, pp. 558–569, Jun. 2006.
- [13] H. V. Worthington *et al.*, "Interventions for preventing oral mucositis for patients with cancer receiving treatment," *Cochrane Database Syst. Rev.*, no. 4, p. CD000978, 2011.
- [14] M. Hallek *et al.*, "Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial," *Lancet Lond. Engl.*, vol. 376, no. 9747, pp. 1164–1174, Oct. 2010.
- [15] G. P. Murphy *et al.*, "Treatment of newly diagnosed metastatic prostate cancer patients with chemotherapy agents in combination with hormones versus hormones alone," *Cancer*, vol. 51, no. 7, pp. 1264–1272, Apr. 1983.
- [16] A. Rossi *et al.*, "Adjuvant chemotherapy with vincristine, cyclophosphamide, and doxorubicin after radiotherapy in local-regional nasopharyngeal cancer: results of a 4-year multicenter randomized study," *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 6, no. 9, pp. 1401–1410, Sep. 1988.
- [17] E. K. Rowinsky, "The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents," *Annu. Rev. Med.*, vol. 48, pp. 353–374, 1997.
- [18] R. H. Blum, S. K. Carter, and K. Agre, "A clinical review of bleomycin--a new antineoplastic agent," *Cancer*, vol. 31, no. 4, pp. 903–914, Apr. 1973.

- [19] T. Hakes, M. Nikrui, G. Magill, and M. Ochoa, "Cervix cancer: treatment with combination vincristine and high doses of methotrexate," *Cancer*, vol. 43, no. 2, pp. 459–464, Feb. 1979.
- [20] R. E. Meyn, L. C. Stephens, N. R. Hunter, and L. Milas, "Apoptosis in murine tumors treated with chemotherapy agents," *Anticancer. Drugs*, vol. 6, no. 3, pp. 443–450, Jun. 1995.
- [21] F. Arcamone *et al.*, "Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peuceetius* var. *caesius*," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 11, no. 6, pp. 1101–1110, Nov. 1969.
- [22] R. H. Blum and S. K. Carter, "Adriamycin. A new anticancer drug with significant clinical activity," *Ann. Intern. Med.*, vol. 80, no. 2, pp. 249–259, Feb. 1974.
- [23] S. Zhou, C. M. Palmeira, and K. B. Wallace, "Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes," *Toxicol. Lett.*, vol. 121, no. 3, pp. 151–157, May 2001.
- [24] A. Skladanowski and J. Konopa, "Relevance of interstrand DNA crosslinking induced by anthracyclines for their biological activity," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 47, no. 12, pp. 2279–2287, Jun. 1994.
- [25] K. M. Tewey, T. C. Rowe, L. Yang, B. D. Halligan, and L. F. Liu, "Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II," *Science*, vol. 226, no. 4673, pp. 466–468, Oct. 1984.
- [26] C. A. Austin and K. L. Marsh, "Eukaryotic DNA topoisomerase II beta," *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.*, vol. 20, no. 3, pp. 215–226, Mar. 1998.
- [27] J. L. Nitiss, "DNA topoisomerases in cancer chemotherapy: using enzymes to generate selective DNA damage," *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl. 2000*, vol. 3, no. 10, pp. 1512–1516, Oct. 2002.
- [28] D. A. Gewirtz, "A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 57, no. 7, pp. 727–741, Apr. 1999.
- [29] P. S. Green and C. Leeuwenburgh, "Mitochondrial dysfunction is an early indicator of doxorubicin-induced apoptosis," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1588, no. 1, pp. 94–101, Oct. 2002.
- [30] Y. Ichikawa *et al.*, "Cardiotoxicity of doxorubicin is mediated through mitochondrial iron accumulation," *J. Clin. Invest.*, vol. 124, no. 2, pp. 617–630, Feb. 2014.
- [31] T. Simůnek, M. Stérba, O. Popelová, M. Adamcová, R. Hrdina, and V. Gersl, "Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron," *Pharmacol. Rep. PR*, vol. 61, no. 1, pp. 154–171, Feb. 2009.
- [32] M. A. Grenier and S. E. Lipshultz, "Epidemiology of anthracycline cardiotoxicity in children and adults," *Semin. Oncol.*, vol. 25, no. 4 Suppl 10, pp. 72–85, Aug. 1998.
- [33] S. M. Swain, F. S. Whaley, and M. S. Ewer, "Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin: a retrospective analysis of three trials," *Cancer*, vol. 97, no. 11, pp. 2869–2879, Jun. 2003.
- [34] S. S. Legha *et al.*, "Reduction of doxorubicin cardiotoxicity by prolonged continuous intravenous infusion," *Ann. Intern. Med.*, vol. 96, no. 2, pp. 133–139, Feb. 1982.
- [35] C. van den Hurk, W. Breed, and W. Dercksen, "Nonpegylated liposomal doxorubicin: reduction in cardiotoxicity, although still severe alopecia," *Anticancer. Drugs*, vol. 26, no. 6, p. 687, Jul. 2015.
- [36] J. J. Wang, E. Cortes, L. F. Sinks, and J. F. Holland, "Therapeutic effect and toxicity of adriamycin in patients with neoplastic disease," *Cancer*, vol. 28, no. 4, pp. 837–843, Oct. 1971.

- [37] R. M. O'Bryan, J. K. Luce, R. W. Talley, J. A. Gottlieb, L. H. Baker, and G. Bonadonna, "Phase II evaluation of adriamycin in human neoplasia," *Cancer*, vol. 32, no. 1, pp. 1–8, Jul. 1973.
- [38] H. Ma, M. Chen, J. Liu, Y. Li, and J. Li, "Serious stomatitis and esophagitis: a peculiar mucous reaction induced by pegylated liposomal doxorubicin," *An. Bras. Dermatol.*, vol. 90, no. 3 Suppl 1, pp. 209–211, Jun. 2015.
- [39] A. J. Weiss, G. E. Metter, W. S. Fletcher, W. L. Wilson, T. B. Grage, and G. Ramirez, "Studies on adriamycin using a weekly regimen demonstrating its clinical effectiveness and lack of cardiac toxicity," *Cancer Treat. Rep.*, vol. 60, no. 7, pp. 813–822, Jul. 1976.
- [40] J. A. Bonner *et al.*, "Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck," *N. Engl. J. Med.*, vol. 354, no. 6, pp. 567–578, Feb. 2006.
- [41] J. S. Cooper, K. Fu, J. Marks, and S. Silverman, "Late effects of radiation therapy in the head and neck region," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 31, no. 5, pp. 1141–1164, Mar. 1995.
- [42] J. F. Fowler, "The linear-quadratic formula and progress in fractionated radiotherapy," *Br. J. Radiol.*, vol. 62, no. 740, pp. 679–694, Aug. 1989.
- [43] K. S. C. Chao, G. Ozyigit, B. N. Tran, M. Cengiz, J. F. Dempsey, and D. A. Low, "Patterns of failure in patients receiving definitive and postoperative IMRT for head-and-neck cancer," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 55, no. 2, pp. 312–321, Feb. 2003.
- [44] P. L. Olive, "The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation," *Radiat. Res.*, vol. 150, no. 5 Suppl, pp. S42–51, Nov. 1998.
- [45] P. A. Riley, "Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation," *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 65, no. 1, pp. 27–33, Jan. 1994.
- [46] A. P. Breen and J. A. Murphy, "Reactions of oxyl radicals with DNA," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 18, no. 6, pp. 1033–1077, Jun. 1995.
- [47] A. Haimovitz-Friedman *et al.*, "Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis," *J. Exp. Med.*, vol. 180, no. 2, pp. 525–535, Aug. 1994.
- [48] K. J. Davies, "Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects," *J. Biol. Chem.*, vol. 262, no. 20, pp. 9895–9901, Jul. 1987.
- [49] E. M. Rosen, R. Day, and V. K. Singh, "New approaches to radiation protection," *Front. Oncol.*, vol. 4, p. 381, 2014.
- [50] J. R. Kouvaris, V. E. Kouloulias, and L. J. Vlahos, "Amifostine: the first selective-target and broad-spectrum radioprotector," *The Oncologist*, vol. 12, no. 6, pp. 738–747, Jun. 2007.
- [51] L. M. Shaw *et al.*, "Human pharmacokinetics of WR-2721," *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 12, no. 8, pp. 1501–1504, Aug. 1986.
- [52] D. Rades, F. Fehlaue, A. Bajrovic, B. Mahlmann, E. Richter, and W. Alberti, "Serious adverse effects of amifostine during radiotherapy in head and neck cancer patients," *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.*, vol. 70, no. 3, pp. 261–264, Mar. 2004.
- [53] P. W. Finch, L. J. Mark Cross, D. F. McAuley, and C. L. Farrell, "Palifermin for the protection and regeneration of epithelial tissues following injury: new findings in basic research and pre-clinical models," *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 17, no. 9, pp. 1065–1087, Sep. 2013.
- [54] M. S. Brown and J. L. Goldstein, "Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth," *J. Lipid Res.*, vol. 21, no. 5, pp. 505–517, Jul. 1980.
- [55] M. Schachter, "Chemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of statins: an update," *Fundam. Clin. Pharmacol.*, vol. 19, no. 1, pp. 117–125, Feb. 2005.

- [56] A. Endo, M. Kuroda, and K. Tanzawa, "Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. 1976," *Atheroscler. Suppl.*, vol. 5, no. 3, pp. 39–42, Oct. 2004.
- [57] D. S. G. Conway, L. A. Pearce, B. S. P. Chin, R. G. Hart, and G. Y. H. Lip, "Prognostic value of plasma von Willebrand factor and soluble P-selectin as indices of endothelial damage and platelet activation in 994 patients with nonvalvular atrial fibrillation," *Circulation*, vol. 107, no. 25, pp. 3141–3145, Jul. 2003.
- [58] Y. Peng, J. Yashphe, and A. L. Demain, "Biotransformation of compactin to pravastatin by *Actinomyces* sp. 2966," *J. Antibiot. (Tokyo)*, vol. 50, no. 12, pp. 1032–1035, Dec. 1997.
- [59] X. Xie and Y. Tang, "Efficient synthesis of simvastatin by use of whole-cell biocatalysis," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 7, pp. 2054–2060, Apr. 2007.
- [60] J. A. Tobert, "Efficacy and long-term adverse effect pattern of lovastatin," *Am. J. Cardiol.*, vol. 62, no. 15, p. 28J–34J, Nov. 1988.
- [61] A. Varbo, J. J. Freiberg, and B. G. Nordestgaard, "Extreme nonfasting remnant cholesterol vs extreme LDL cholesterol as contributors to cardiovascular disease and all-cause mortality in 90000 individuals from the general population," *Clin. Chem.*, vol. 61, no. 3, pp. 533–543, Mar. 2015.
- [62] Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaboration *et al.*, "Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: a meta-analysis of data from 170,000 participants in 26 randomised trials," *Lancet Lond. Engl.*, vol. 376, no. 9753, pp. 1670–1681, Nov. 2010.
- [63] J. R. Downs *et al.*, "Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study," *JAMA*, vol. 279, no. 20, pp. 1615–1622, May 1998.
- [64] D. Plass, T. Vos, C. Hornberg, C. Scheidt-Nave, H. Zeeb, and A. Krämer, "Trends in disease burden in Germany: results, implications and limitations of the Global Burden of Disease study," *Dtsch. Arzteblatt Int.*, vol. 111, no. 38, pp. 629–638, Sep. 2014.
- [65] B. A. Johnson, A. T. Iacono, A. Zeevi, K. R. McCurry, and S. R. Duncan, "Statin use is associated with improved function and survival of lung allografts," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 167, no. 9, pp. 1271–1278, May 2003.
- [66] A. D. Heymann, R. Ravona-Springer, E. L. Moshier, J. Godbold, and M. S. Beeri, "Statin Use is Associated with Better Cognitive Function in Elderly with Type 2 Diabetes," *J. Alzheimers Dis. JAD*, vol. 47, no. 1, pp. 55–59, Jul. 2015.
- [67] B. Oh *et al.*, "Synergistic killing effect of imatinib and simvastatin on imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells," *Anticancer. Drugs*, vol. 24, no. 1, pp. 20–31, Jan. 2013.
- [68] M. Zanfardino *et al.*, "Simvastatin reduces melanoma progression in a murine model," *Int. J. Oncol.*, vol. 43, no. 6, pp. 1763–1770, Dec. 2013.
- [69] J. S. Kutner *et al.*, "Safety and benefit of discontinuing statin therapy in the setting of advanced, life-limiting illness: a randomized clinical trial," *JAMA Intern. Med.*, vol. 175, no. 5, pp. 691–700, May 2015.
- [70] C. R. Harper and T. A. Jacobson, "The broad spectrum of statin myopathy: from myalgia to rhabdomyolysis," *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 18, no. 4, pp. 401–408, Aug. 2007.
- [71] D. Gaist, U. Jeppesen, M. Andersen, L. A. García Rodríguez, J. Hallas, and S. H. Sindrup, "Statins and risk of polyneuropathy: a case-control study," *Neurology*, vol. 58, no. 9, pp. 1333–1337, May 2002.

- [72] J. J. de Langen and E. P. van Puijenbroek, “HMG-CoA-reductase inhibitors and neuropathy: reports to the Netherlands Pharmacovigilance Centre,” *Neth. J. Med.*, vol. 64, no. 9, pp. 334–338, Oct. 2006.
- [73] J. M. Sauret, G. Marinides, and G. K. Wang, “Rhabdomyolysis,” *Am. Fam. Physician*, vol. 65, no. 5, pp. 907–912, Mar. 2002.
- [74] Y. Osaki *et al.*, “Skeletal muscle-specific HMG-CoA reductase knockout mice exhibit rhabdomyolysis: A model for statin-induced myopathy,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Sep. 2015.
- [75] J. A. Staffa, J. Chang, and L. Green, “Cerivastatin and reports of fatal rhabdomyolysis,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 346, no. 7, pp. 539–540, Feb. 2002.
- [76] M. Molokhia, P. McKeigue, V. Curcin, and A. Majeed, “Statin induced myopathy and myalgia: time trend analysis and comparison of risk associated with statin class from 1991-2006,” *PloS One*, vol. 3, no. 6, p. e2522, Jun. 2008.
- [77] M. Law and A. R. Rudnicka, “Statin safety: a systematic review,” *Am. J. Cardiol.*, vol. 97, no. 8A, p. 52C–60C, Apr. 2006.
- [78] P. H. Jones and M. H. Davidson, “Reporting rate of rhabdomyolysis with fenofibrate + statin versus gemfibrozil + any statin,” *Am. J. Cardiol.*, vol. 95, no. 1, pp. 120–122, Jan. 2005.
- [79] B. Moosmann and C. Behl, “Selenoprotein synthesis and side-effects of statins,” *Lancet Lond. Engl.*, vol. 363, no. 9412, pp. 892–894, Mar. 2004.
- [80] S. Borgquist, R. M. Tamimi, W. Y. Chen, J. E. Garber, A. H. Eliassen, and T. P. Ahern, “Statin Use and Breast Cancer Risk in the Nurses’ Health Study,” *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.*, vol. 25, no. 1, pp. 201–206, Jan. 2016.
- [81] K. M. Dale, C. I. Coleman, N. N. Henyan, J. Kluger, and C. M. White, “Statins and cancer risk: a meta-analysis,” *JAMA*, vol. 295, no. 1, pp. 74–80, Jan. 2006.
- [82] S. F. Nielsen, B. G. Nordestgaard, and S. E. Bojesen, “Statin use and reduced cancer-related mortality,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 367, no. 19, pp. 1792–1802, Nov. 2012.
- [83] E. Sieczkowski, C. Lehner, P. F. Ambros, and M. Hohenegger, “Double impact on p-glycoprotein by statins enhances doxorubicin cytotoxicity in human neuroblastoma cells,” *Int. J. Cancer*, vol. 126, no. 9, pp. 2025–2035, May 2010.
- [84] T. Sanli *et al.*, “Lovastatin sensitizes lung cancer cells to ionizing radiation: modulation of molecular pathways of radioresistance and tumor suppression,” *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer*, vol. 6, no. 3, pp. 439–450, Mar. 2011.
- [85] J. Damrot, T. Nübel, B. Epe, W. P. Roos, B. Kaina, and G. Fritz, “Lovastatin protects human endothelial cells from the genotoxic and cytotoxic effects of the anticancer drugs doxorubicin and etoposide,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 149, no. 8, pp. 988–997, Dec. 2006.
- [86] J. Huelsenbeck, C. Henninger, A. Schad, K. J. Lackner, B. Kaina, and G. Fritz, “Inhibition of Rac1 signaling by lovastatin protects against anthracycline-induced cardiac toxicity,” *Cell Death Dis.*, vol. 2, p. e190, 2011.
- [87] C. Henninger *et al.*, “The lipid lowering drug lovastatin protects against doxorubicin-induced hepatotoxicity,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 261, no. 1, pp. 66–73, May 2012.
- [88] M. Yoshida, I. Shiojima, H. Ikeda, and I. Komuro, “Chronic doxorubicin cardiotoxicity is mediated by oxidative DNA damage-ATM-p53-apoptosis pathway and attenuated by pitavastatin through the inhibition of Rac1 activity,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 47, no. 5, pp. 698–705, Nov. 2009.

- [89] W. Feleszko *et al.*, “Lovastatin potentiates antitumor activity and attenuates cardiotoxicity of doxorubicin in three tumor models in mice,” *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 6, no. 5, pp. 2044–2052, May 2000.
- [90] T. Nübel, J. Damrot, W. P. Roos, B. Kaina, and G. Fritz, “Lovastatin protects human endothelial cells from killing by ionizing radiation without impairing induction and repair of DNA double-strand breaks,” *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 12, no. 3 Pt 1, pp. 933–939, Feb. 2006.
- [91] M. Mahmoudi, I. Gorenne, J. Mercer, N. Figg, T. Littlewood, and M. Bennett, “Statins use a novel Nijmegen breakage syndrome-1-dependent pathway to accelerate DNA repair in vascular smooth muscle cells,” *Circ. Res.*, vol. 103, no. 7, pp. 717–725, Sep. 2008.
- [92] V. Haydont *et al.*, “Successful mitigation of delayed intestinal radiation injury using pravastatin is not associated with acute injury improvement or tumor protection,” *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 68, no. 5, pp. 1471–1482, Aug. 2007.
- [93] J. Wang, M. Boerma, Q. Fu, A. Kulkarni, L. M. Fink, and M. Hauer-Jensen, “Simvastatin ameliorates radiation enteropathy development after localized, fractionated irradiation by a protein C-independent mechanism,” *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 68, no. 5, pp. 1483–1490, Aug. 2007.
- [94] L. Van Aelst and C. D’Souza-Schorey, “Rho GTPases and signaling networks,” *Genes Dev.*, vol. 11, no. 18, pp. 2295–2322, Sep. 1997.
- [95] A. Hall, “Rho GTPases and the actin cytoskeleton,” *Science*, vol. 279, no. 5350, pp. 509–514, Jan. 1998.
- [96] S. A. Woodcock *et al.*, “Tiam1-Rac signaling counteracts Eg5 during bipolar spindle assembly to facilitate chromosome congression,” *Curr. Biol. CB*, vol. 20, no. 7, pp. 669–675, Apr. 2010.
- [97] C. A. Jefferies and L. A. O’Neill, “Rac1 regulates interleukin 1-induced nuclear factor kappaB activation in an inhibitory protein kappaBalpha-independent manner by enhancing the ability of the p65 subunit to transactivate gene expression,” *J. Biol. Chem.*, vol. 275, no. 5, pp. 3114–3120, Feb. 2000.
- [98] O. A. Coso, H. Teramoto, W. F. Simonds, and J. S. Gutkind, “Signaling from G protein-coupled receptors to c-Jun kinase involves beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting on a Ras and Rac1-dependent pathway,” *J. Biol. Chem.*, vol. 271, no. 8, pp. 3963–3966, Feb. 1996.
- [99] G. Fritz, C. Henninger, and J. Huelsenbeck, “Potential use of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) as radioprotective agents,” *Br. Med. Bull.*, vol. 97, pp. 17–26, 2011.
- [100] G. Fritz, “Targeting the mevalonate pathway for improved anticancer therapy,” *Curr. Cancer Drug Targets*, vol. 9, no. 5, pp. 626–638, Aug. 2009.
- [101] F. M. Vega and A. J. Ridley, “Rho GTPases in cancer cell biology,” *FEBS Lett.*, vol. 582, no. 14, pp. 2093–2101, Jun. 2008.
- [102] S. A. Benitah, P. F. Valerón, L. van Aelst, C. J. Marshall, and J. C. Lacal, “Rho GTPases in human cancer: an unresolved link to upstream and downstream transcriptional regulation,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1705, no. 2, pp. 121–132, Dec. 2004.
- [103] A. B. Jaffe and A. Hall, “Rho GTPases: biochemistry and biology,” *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 21, pp. 247–269, 2005.
- [104] J. L. Bos, H. Rehmann, and A. Wittinghofer, “GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins,” *Cell*, vol. 129, no. 5, pp. 865–877, Jun. 2007.
- [105] A. Hall, “G proteins and small GTPases: distant relatives keep in touch,” *Science*, vol. 280, no. 5372, pp. 2074–2075, Jun. 1998.
- [106] I. Cicha, N. Schneiderhan-Marra, A. Yilmaz, C. D. Garlich, and M. Goppelt-Struebe, “Monitoring the cellular effects of HMG-CoA reductase inhibitors in vitro

- and ex vivo,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 24, no. 11, pp. 2046–2050, Nov. 2004.
- [107] V. Haydont, C. Bourgier, and M.-C. Vozenin-Brotons, “Rho/ROCK pathway as a molecular target for modulation of intestinal radiation-induced toxicity,” *Br. J. Radiol.*, vol. 80 Spec No 1, pp. S32–40, Sep. 2007.
- [108] F. Wartlick, A. Bopp, C. Henninger, and G. Fritz, “DNA damage response (DDR) induced by topoisomerase II poisons requires nuclear function of the small GTPase Rac,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1833, no. 12, pp. 3093–3103, Dec. 2013.
- [109] C. Henninger *et al.*, “Chronic heart damage following doxorubicin treatment is alleviated by lovastatin,” *Pharmacol. Res.*, vol. 91, pp. 47–56, Jan. 2015.
- [110] J. O’Brien, I. Wilson, T. Orton, and F. Pognan, “Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity,” *Eur. J. Biochem. FEBS*, vol. 267, no. 17, pp. 5421–5426, Sep. 2000.
- [111] S. A. Ahmed, R. M. Gogal, and J. E. Walsh, “A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay,” *J. Immunol. Methods*, vol. 170, no. 2, pp. 211–224, Apr. 1994.
- [112] T. Mosmann, “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays,” *J. Immunol. Methods*, vol. 65, no. 1–2, pp. 55–63, Dec. 1983.
- [113] I. Nicoletti, G. Migliorati, M. C. Pagliacci, F. Grignani, and C. Riccardi, “A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry,” *J. Immunol. Methods*, vol. 139, no. 2, pp. 271–279, Jun. 1991.
- [114] M. Frankowski *et al.*, “Microflow cytometers with integrated hydrodynamic focusing,” *Sensors*, vol. 13, no. 4, pp. 4674–4693, Apr. 2013.
- [115] P. Paiè, F. Bragheri, R. M. Vazquez, and R. Osellame, “Straightforward 3D hydrodynamic focusing in femtosecond laser fabricated microfluidic channels,” *Lab. Chip*, vol. 14, no. 11, pp. 1826–1833, Jun. 2014.
- [116] G. Valet, “Past and present concepts in flow cytometry: a European perspective,” *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, vol. 17, no. 3, pp. 213–222, Sep. 2003.
- [117] Z. Guo *et al.*, “Induction of H2AX phosphorylation in tumor cells by gossypol acetic acid is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) family,” *Cancer Cell Int.*, vol. 14, no. 1, p. 141, 2014.
- [118] I. M. Ward and J. Chen, “Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress,” *J. Biol. Chem.*, vol. 276, no. 51, pp. 47759–47762, Dec. 2001.
- [119] R. T. Abraham, “Checkpoint signalling: focusing on 53BP1,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 4, no. 12, pp. E277–279, Dec. 2002.
- [120] T. J. Mead and V. Lefebvre, “Proliferation assays (BrdU and EdU) on skeletal tissue sections,” *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 1130, pp. 233–243, 2014.
- [121] P. Y. Lee, J. Costumbrado, C.-Y. Hsu, and Y. H. Kim, “Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments,” *J. Vis. Exp. JoVE*, no. 62, Apr. 2012.
- [122] H. M. Welch, “The polymerase chain reaction,” *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, vol. 878, pp. 71–88, 2012.
- [123] M. Tajadini, M. Panjehpour, and S. H. Javanmard, “Comparison of SYBR Green and TaqMan methods in quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of four adenosine receptor subtypes,” *Adv. Biomed. Res.*, vol. 3, p. 85, 2014.
- [124] D. E. Pegg, “Viability assays for preserved cells, tissues, and organs,” *Cryobiology*, vol. 26, no. 3, pp. 212–231, Jun. 1989.
- [125] R. Hamid, Y. Rotshteyn, L. Rabadi, R. Parikh, and P. Bullock, “Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening,” *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA*, vol. 18, no. 5, pp. 703–710, Oct. 2004.

- [126] I. H. Lee *et al.*, “Atg7 modulates p53 activity to regulate cell cycle and survival during metabolic stress,” *Science*, vol. 336, no. 6078, pp. 225–228, Apr. 2012.
- [127] F. Colotta, J. M. Wang, N. Polentarutti, and A. Mantovani, “Expression of c-fos protooncogene in normal human peripheral blood granulocytes,” *J. Exp. Med.*, vol. 165, no. 4, pp. 1224–1229, Apr. 1987.
- [128] K. Nakachi, K. Imai, S. Hayashi, and K. Kawajiri, “Polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population,” *Cancer Res.*, vol. 53, no. 13, pp. 2994–2999, Jul. 1993.
- [129] K. Sandrock, H. Bielek, K. Schradi, G. Schmidt, and N. Klugbauer, “The nuclear import of the small GTPase Rac1 is mediated by the direct interaction with karyopherin alpha2,” *Traffic Cph. Den.*, vol. 11, no. 2, pp. 198–209, Feb. 2010.
- [130] J. K. Liao and U. Laufs, “Pleiotropic effects of statins,” *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 45, pp. 89–118, 2005.
- [131] P. Adamson, C. J. Marshall, A. Hall, and P. A. Tilbrook, “Post-translational modifications of p21rho proteins,” *J. Biol. Chem.*, vol. 267, no. 28, pp. 20033–20038, Oct. 1992.
- [132] C. Ostrau *et al.*, “Lovastatin attenuates ionizing radiation-induced normal tissue damage in vivo,” *Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol.*, vol. 92, no. 3, pp. 492–499, Sep. 2009.
- [133] M. Kajstura, H. D. Halicka, J. Pryjma, and Z. Darzynkiewicz, “Discontinuous fragmentation of nuclear DNA during apoptosis revealed by discrete ‘sub-G1’ peaks on DNA content histograms,” *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.*, vol. 71, no. 3, pp. 125–131, Mar. 2007.
- [134] K. Keyomarsi, L. Sandoval, V. Band, and A. B. Pardee, “Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin,” *Cancer Res.*, vol. 51, no. 13, pp. 3602–3609, Jul. 1991.
- [135] M. Jakóbsiak, S. Bruno, J. S. Skierski, and Z. Darzynkiewicz, “Cell cycle-specific effects of lovastatin,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 88, no. 9, pp. 3628–3632, May 1991.
- [136] R. J. Muschel, H. B. Zhang, G. Iliakis, and W. G. McKenna, “Cyclin B expression in HeLa cells during the G2 block induced by ionizing radiation,” *Cancer Res.*, vol. 51, no. 19, pp. 5113–5117, Oct. 1991.
- [137] S. T. Sonis, “Mucositis as a biological process: a new hypothesis for the development of chemotherapy-induced stomatotoxicity,” *Oral Oncol.*, vol. 34, no. 1, pp. 39–43, Jan. 1998.
- [138] J. Martin *et al.*, “The weaned pig as a model for Doxorubicin-induced mucositis,” *Chemotherapy*, vol. 60, no. 1, pp. 24–36, 2014.
- [139] S. Nilsson, J. Huelsenbeck, and G. Fritz, “Mevalonate pathway inhibitors affect anticancer drug-induced cell death and DNA damage response of human sarcoma cells,” *Cancer Lett.*, vol. 304, no. 1, pp. 60–69, May 2011.
- [140] Y. H. Ling, A. K. el-Naggar, W. Priebe, and R. Perez-Soler, “Cell cycle-dependent cytotoxicity, G2/M phase arrest, and disruption of p34cdc2/cyclin B1 activity induced by doxorubicin in synchronized P388 cells,” *Mol. Pharmacol.*, vol. 49, no. 5, pp. 832–841, May 1996.
- [141] W. Y. Siu, C. H. Yam, and R. Y. Poon, “G1 versus G2 cell cycle arrest after adriamycin-induced damage in mouse Swiss3T3 cells,” *FEBS Lett.*, vol. 461, no. 3, pp. 299–305, Nov. 1999.
- [142] A. Martirosyan, J. W. Clendening, C. A. Goard, and L. Z. Penn, “Lovastatin induces apoptosis of ovarian cancer cells and synergizes with doxorubicin: potential therapeutic relevance,” *BMC Cancer*, vol. 10, p. 103, 2010.

- [143] S. Rao, M. Lowe, T. W. Herliczek, and K. Keyomarsi, "Lovastatin mediated G1 arrest in normal and tumor breast cells is through inhibition of CDK2 activity and redistribution of p21 and p27, independent of p53," *Oncogene*, vol. 17, no. 18, pp. 2393–2402, Nov. 1998.
- [144] S. Rao, D. C. Porter, X. Chen, T. Herliczek, M. Lowe, and K. Keyomarsi, "Lovastatin-mediated G1 arrest is through inhibition of the proteasome, independent of hydroxymethyl glutaryl-CoA reductase," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 96, no. 14, pp. 7797–7802, Jul. 1999.
- [145] E. P. Rogakou, D. R. Pilch, A. H. Orr, V. S. Ivanova, and W. M. Bonner, "DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139," *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 10, pp. 5858–5868, Mar. 1998.
- [146] O. Fernandez-Capetillo *et al.*, "DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1," *Nat. Cell Biol.*, vol. 4, no. 12, pp. 993–997, Dec. 2002.
- [147] C. Rosette and M. Karin, "Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors," *Science*, vol. 274, no. 5290, pp. 1194–1197, Nov. 1996.
- [148] K. Suzuki, M. Ojima, S. Kodama, and M. Watanabe, "Radiation-induced DNA damage and delayed induced genomic instability," *Oncogene*, vol. 22, no. 45, pp. 6988–6993, Oct. 2003.
- [149] P. Adamson, H. F. Paterson, and A. Hall, "Intracellular localization of the P21rho proteins," *J. Cell Biol.*, vol. 119, no. 3, pp. 617–627, Nov. 1992.
- [150] D. Michaelson *et al.*, "Rac1 accumulates in the nucleus during the G2 phase of the cell cycle and promotes cell division," *J. Cell Biol.*, vol. 181, no. 3, pp. 485–496, May 2008.
- [151] Y. L. Lyu *et al.*, "Topoisomerase IIbeta mediated DNA double-strand breaks: implications in doxorubicin cardiotoxicity and prevention by dexrazoxane," *Cancer Res.*, vol. 67, no. 18, pp. 8839–8846, Sep. 2007.
- [152] S. C. Huelsenbeck *et al.*, "Rac1 protein signaling is required for DNA damage response stimulated by topoisomerase II poisons," *J. Biol. Chem.*, vol. 287, no. 46, pp. 38590–38599, Nov. 2012.
- [153] V. Ziegler, A. Albers, and G. Fritz, "Lovastatin protects keratinocytes from DNA damage-related pro-apoptotic stress responses stimulated by anticancer therapeutics," *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1863, no. 6 Pt A, pp. 1082–1092, Jun. 2016.
- [154] H. P. Rodemann and M. A. Blaese, "Responses of normal cells to ionizing radiation," *Semin. Radiat. Oncol.*, vol. 17, no. 2, pp. 81–88, Apr. 2007.
- [155] R. D. Woessner, M. R. Mattern, C. K. Mirabelli, R. K. Johnson, and F. H. Drake, "Proliferation- and cell cycle-dependent differences in expression of the 170 kilodalton and 180 kilodalton forms of topoisomerase II in NIH-3T3 cells," *Cell Growth Differ. Mol. Biol. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 2, no. 4, pp. 209–214, Apr. 1991.
- [156] A. Faggad *et al.*, "Topoisomerase IIalpha mRNA and protein expression in ovarian carcinoma: correlation with clinicopathological factors and prognosis," *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc*, vol. 22, no. 4, pp. 579–588, Apr. 2009.
- [157] W. Chen, J. Qiu, and Y. M. Shen, "Topoisomerase II α , rather than II β , is a promising target in development of anti-cancer drugs," *Drug Discov. Ther.*, vol. 6, no. 5, pp. 230–237, Oct. 2012.
- [158] S. J. Froelich-Ammon and N. Osheroff, "Topoisomerase poisons: harnessing the dark side of enzyme mechanism," *J. Biol. Chem.*, vol. 270, no. 37, pp. 21429–21432, Sep. 1995.
- [159] Y. Gao, J. B. Dickerson, F. Guo, J. Zheng, and Y. Zheng, "Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 20, pp. 7618–7623, May 2004.

- [160] A. Shutes, C. Onesto, V. Picard, B. Leblond, F. Schweighoffer, and C. J. Der, "Specificity and mechanism of action of EHT 1864, a novel small molecule inhibitor of Rac family small GTPases," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 49, pp. 35666–35678, Dec. 2007.
- [161] V. Sidarala, R. Veluthakal, K. Syeda, and A. Kowluru, "EHT 1864, a small molecule inhibitor of Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1), attenuates glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β -cells," *Cell. Signal.*, vol. 27, no. 6, pp. 1159–1167, Jun. 2015.
- [162] J. Ohlig, C. Henninger, S. Zander, M. Merx, M. Kelm, and G. Fritz, "Rac1-mediated cardiac damage causes diastolic dysfunction in a mouse model of subacute doxorubicin-induced cardiotoxicity," *Arch. Toxicol.*, vol. 92, no. 1, pp. 441–453, Jan. 2018.
- [163] V. Ziegler *et al.*, "Rho inhibition by lovastatin affects apoptosis and DSB repair of primary human lung cells in vitro and lung tissue in vivo following fractionated irradiation," *Cell Death Dis.*, vol. 8, no. 8, p. e2978, Aug. 2017.
- [164] M. Ozaki *et al.*, "Inhibition of the Rac1 GTPase protects against nonlethal ischemia/reperfusion-induced necrosis and apoptosis in vivo," *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, vol. 14, no. 2, pp. 418–429, Feb. 2000.
- [165] N. Osheroff, A. H. Corbett, and M. J. Robinson, "Mechanism of action of topoisomerase II-targeted antineoplastic drugs," *Adv. Pharmacol. San Diego Calif*, vol. 29B, pp. 105–126, 1994.
- [166] G. M. Ross, "Induction of cell death by radiotherapy," *Endocr. Relat. Cancer*, vol. 6, no. 1, pp. 41–44, Mar. 1999.
- [167] C. Müller-Tidow *et al.*, "The cyclin A1-CDK2 complex regulates DNA double-strand break repair," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, no. 20, pp. 8917–8928, Oct. 2004.
- [168] J.-H. Lee and T. T. Paull, "ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex," *Science*, vol. 308, no. 5721, pp. 551–554, Apr. 2005.
- [169] Z. Cai, N. H. Chehab, and N. P. Pavletich, "Structure and activation mechanism of the CHK2 DNA damage checkpoint kinase," *Mol. Cell*, vol. 35, no. 6, pp. 818–829, Sep. 2009.
- [170] K. K. Khanna and S. P. Jackson, "DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection," *Nat. Genet.*, vol. 27, no. 3, pp. 247–254, Mar. 2001.
- [171] G. Iliakis, Y. Wang, J. Guan, and H. Wang, "DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation," *Oncogene*, vol. 22, no. 37, pp. 5834–5847, Sep. 2003.
- [172] G. Della Gatta, M. Bansal, A. Ambesi-Impiombato, D. Antonini, C. Missero, and D. di Bernardo, "Direct targets of the TRP63 transcription factor revealed by a combination of gene expression profiling and reverse engineering," *Genome Res.*, vol. 18, no. 6, pp. 939–948, Jun. 2008.
- [173] E. R. Flores *et al.*, "p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage," *Nature*, vol. 416, no. 6880, pp. 560–564, Apr. 2002.
- [174] M. D. Westfall, A. S. Joyner, C. E. Barbieri, M. Livingstone, and J. A. Pietenpol, "Ultraviolet radiation induces phosphorylation and ubiquitin-mediated degradation of DeltaNp63alpha," *Cell Cycle Georget. Tex.*, vol. 4, no. 5, pp. 710–716, May 2005.
- [175] C. J. Lowenstein and E. Padalko, "iNOS (NOS2) at a glance," *J. Cell Sci.*, vol. 117, no. Pt 14, pp. 2865–2867, Jun. 2004.
- [176] W. Liu and S. Wu, "Differential roles of nitric oxide synthases in regulation of ultraviolet B light-induced apoptosis," *Nitric Oxide Biol. Chem. Off. J. Nitric Oxide Soc.*, vol. 23, no. 3, pp. 199–205, Nov. 2010.
- [177] W. C. Sessa, "eNOS at a glance," *J. Cell Sci.*, vol. 117, no. Pt 12, pp. 2427–2429, May 2004.

- [178] H. S. Park *et al.*, “Chronic low-dose radiation inhibits the cells death by cytotoxic high-dose radiation increasing the level of AKT and acinus proteins via NF- κ B activation,” *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 89, no. 5, pp. 371–377, May 2013.
- [179] F. Ma, F. Chen, Q. Ren, and Z. Han, “Lovastatin restores the function of endothelial progenitor cells damaged by oxLDL,” *Acta Pharmacol. Sin.*, vol. 30, no. 5, pp. 545–552, May 2009.
- [180] U. Laufs and J. K. Liao, “Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 37, pp. 24266–24271, Sep. 1998.
- [181] D. Ulrich, E.-M. Noah, D. von Heimburg, and N. Pallua, “TIMP-1, MMP-2, MMP-9, and PIIINP as serum markers for skin fibrosis in patients following severe burn trauma,” *Plast. Reconstr. Surg.*, vol. 111, no. 4, pp. 1423–1431, Apr. 2003.
- [182] D. E. Gomez, D. F. Alonso, H. Yoshiji, and U. P. Thorgeirsson, “Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions,” *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 74, no. 2, pp. 111–122, Oct. 1997.
- [183] J. Araya *et al.*, “Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 production in human lung epithelial cells,” *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 280, no. 1, pp. L30–38, Jan. 2001.
- [184] W. H. Lee, J. P. Warrington, W. E. Sonntag, and Y. W. Lee, “Irradiation alters MMP-2/TIMP-2 system and collagen type IV degradation in brain,” *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, vol. 82, no. 5, pp. 1559–1566, Apr. 2012.
- [185] C. Strup-Perrot, M.-C. Vozenin-Brotans, M. Vandamme, M. Benderitter, and D. Mathe, “Expression and activation of MMP -2, -3, -9, -14 are induced in rat colon after abdominal X-irradiation,” *Scand. J. Gastroenterol.*, vol. 41, no. 1, pp. 60–70, Jan. 2006.
- [186] Z. Luan, A. J. Chase, and A. C. Newby, “Statins inhibit secretion of metalloproteinases-1, -2, -3, and -9 from vascular smooth muscle cells and macrophages,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 23, no. 5, pp. 769–775, May 2003.
- [187] D. T. Denhardt, B. Feng, D. R. Edwards, E. T. Cocuzzi, and U. M. Malyankar, “Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP, aka EPA): structure, control of expression and biological functions,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 59, no. 3, pp. 329–341, Sep. 1993.
- [188] P. C. Heinrich, J. V. Castell, and T. Andus, “Interleukin-6 and the acute phase response,” *Biochem. J.*, vol. 265, no. 3, pp. 621–636, Feb. 1990.
- [189] E. S. de Bont *et al.*, “Diagnostic value of plasma levels of tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) and interleukin-6 (IL-6) in newborns with sepsis,” *Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992*, vol. 83, no. 7, pp. 696–699, Jul. 1994.
- [190] S. K. Gupta, P. G. Lysko, K. Pillarisetti, E. Ohlstein, and J. M. Stadel, “Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines,” *J. Biol. Chem.*, vol. 273, no. 7, pp. 4282–4287, Feb. 1998.
- [191] N. E. Azie, D. C. Brater, P. A. Becker, D. R. Jones, and S. D. Hall, “The interaction of diltiazem with lovastatin and pravastatin,” *Clin. Pharmacol. Ther.*, vol. 64, no. 4, pp. 369–377, Oct. 1998.
- [192] J. Armitage, “The safety of statins in clinical practice,” *Lancet Lond. Engl.*, vol. 370, no. 9601, pp. 1781–1790, Nov. 2007.
- [193] A. Thibault *et al.*, “Phase I study of lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway, in patients with cancer,” *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 2, no. 3, pp. 483–491, Mar. 1996.

- [194] S. A. Holstein, H. R. Knapp, G. H. Clamon, D. J. Murry, and R. J. Hohl, "Pharmacodynamic effects of high dose lovastatin in subjects with advanced malignancies," *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 57, no. 2, pp. 155–164, Jan. 2006.
- [195] X.-F. Qi *et al.*, "HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis of lymphoma cells by promoting ROS generation and regulating Akt, Erk and p38 signals via suppression of mevalonate pathway," *Cell Death Dis.*, vol. 4, p. e518, Feb. 2013.
- [196] B. Mathew *et al.*, "Simvastatin attenuates radiation-induced murine lung injury and dysregulated lung gene expression," *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 44, no. 3, pp. 415–422, Mar. 2011.
- [197] V. Haydont *et al.*, "Pravastatin Inhibits the Rho/CCN2/extracellular matrix cascade in human fibrosis explants and improves radiation-induced intestinal fibrosis in rats," *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 13, no. 18 Pt 1, pp. 5331–5340, Sep. 2007.

7 Anhang

7.1 Primerliste

Genprodukt	Sense Primer	Anti-sense Primer
8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1), nuclear gene encoding mitochondrial protein	AAGAGGTGGCTCAGAAAT	GATGTTGTTGTTGGAGGAA
Actin, beta (ACTB)	TGGCATCCACGAAACTACC	GTGTTGGCGTACAGGCTCTT
APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1 (APEX1)	AGGATTAGATTGGGTAAAGGA	GCTGGTAGTTTGTCTCTG
Ataxia telangiectasia mutated (ATM)	CAAGATGTTTCATAGAGTT	TGAGGAAGATAGTAAGAG
Autophagy related 3 homolog (S. cerevisiae) (ATG3)	AGGACAATATAAGGCTTCAA	TTCCAACAATCCACTCTC
Autophagy related 7 homolog (S. cerevisiae) (ATG7)	GAACCTCAGTGAATGTATG	AACCTTGTCCAAGTCTAA
Baculoviral IAP repeat-containing 3 (BIRC3)	TGGTAATGAGATGTGATG	GTAAAGAGGTTCTGAGTC
B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2), nuclear gene encoding mitochondrial protein	CGACTCCTGATTCATTTGG	TCTACTTCTCTGTGATGT
BCL2-associated X protein (BAX)	ATCAGATGTGGTCTATAATG	CAGAAGGCACTAATCAAG
Beclin 1, autophagy related (BECN1)	GGATGGAAGGGTCTAAGA	CTGTGGTAAGTAATGGAG
BH3 interacting domain death agonist (BID)	GAAGACAGGCTGGAGATA	GTGTGGATGATATGAAAGGC
Breast cancer 1, early onset (BRCA1)	AAGACTTCTACAGAGTGAA	CAGTTCCAAGGTTAGAGA
Breast cancer 2, early onset (BRCA2)	AACAACAATTACGAAACCA	AACATTCCTTCCTAAGTCTA
Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase (CASP2)	GAGAGAAAGAACTGGAATT	TCTGGTCACATAGAACAAT
CD44 molecule (Indian blood group) (CD44)	GGACCAATTACCATAACTATT	AGGATTTCGTTCTGTATTCT
Cell division cycle 25 homolog A (S. pombe) (CDC25A)	GTGAAGAACAACAGTAATC	TGAGGTAGGGAATGTATT
Cell division cycle 25 homolog B (S. pombe) (CDC25B)	CGTGACCTTGATTGAGTT	TCCCGGAAGTTTGCTAA
Chemokine (C-X-C motif) receptor 4 (CXCR4)	GCCTTACTACATTGGGAT	ACAGTGTTCTCAAACCTCA
CHK1 checkpoint homolog (S. pombe) (CHEK1)	CCACCTCTTCATAACAACAA	TAAATCACAATCGCCACTC
CHK2 checkpoint homolog (S. pombe) (CHEK2)	GCACTGTCACTAAGCAGAAAT	AGGCACCACTTCCAAGAG
Cyclin A1 (CCNA1)	ATTTCAACACAGTTTCCC	CAGCATATTCAGTCACATT
Cyclin B1 (CCNB1)	CCTTCGGAGAGCATCTAA	CATAGTTAGTTCCATCAGGTATT
Cyclin E1 (CCNE1)	GCAAATAGAGAGGAGATC	ATTAACCAATCCAGAAAGAAAT
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A)	TACATCTTCTGCCTTAGT	TCTTAGGAACCTCTCAATT
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1) (CDKN1B)	ACAGCTCGAATTAAGATA	CTTATACAGGATGTCCATT

Anhang

Genprodukt	Sense Primer	Anti-sense Primer
Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1 (CYP1A1)	CTGCTTAGCCTAGTCA AC	GGTAGGTAGCGAAG AATAG
Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1 (CYP1B1)	TCCGTCCCCATCCCAA TC	CCTCACTGGAAGCT TTAACT
Damage-specific DNA binding protein 2, 48kDa (DDB2)	TTTAACCCTCTCAATA CCA	CTACTAGCAGACAC ATCC
DNA-damage-inducible transcript 3 (DDIT3)	ACTGAGCGTATCATGT TAA	CAGGTGTGGTGATG TATG
Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1 (ERCC1)	AGGAAGAAATTTGTGA TAC	TGTGTAGATCGGAA TAAG
Fanconi anemia, complementation group C (FANCC)	AGATGTATGAAGCCTT GAA	AGACAACATAAGCA CCAT
Fas (TNF receptor superfamily, member 6) (FAS)	TTATCTGATGTTGACT TGAGTAA	GGCTTCATTGACAC CATT
Fas ligand (TNF superfamily, member 6) (FASLG)	CAATCTTACCAGTGCT GAT	AATCCCAAAGTGCT TCTC
FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS)	TCAGTGGAACCTGTCA AGA	TGGATGATGCTGGG AACA
Flap structure-specific endonuclease 1 (FEN1)	CGGGAGAATGACATC AAG	AACAGCAATCAGGA ACTG
Glutathione peroxidase 1 (GPX1)	GCCAAGAACGAAGAG ATT	TCGAAGAGCATGAA GTTG
Glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1)	ACTATCCTTCGTGAAC ATC	AGACACAACCACTA ACAG
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	CATGAGAAGTATGACA ACAG	ATGAGTCCTTCCAC GATA
Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha (GADD45A)	ATCCACATTCATCTCA AT	GTAAC TACAAAGGT ATTTCA
Heat shock 70kDa protein 1B (HSPA1B)	GGACTTTGACAACAGG CT	GCTTGTCTGGCTG ATGT
Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1 (HSP90AA1)	AGTTATCCTACACCTG AA	CATCATCGCTTACT TCTT
Heme oxygenase (decycling) 1 (HMOX1)	CAACAAAGTGCAAGA TTC	AGAAAGCTGAGTGT AAGG
HUS1 checkpoint homolog (S. pombe) (HUS1)	TGTTATCTATGTCAAG CAGTA	CGGTTCTGTAAAGT CCTT
Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor) (HIF1A)	TATTTGCGTGTGAGGA AA	CATCTGTGAGAACC ATAAC
Integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12) (ITGB1)	GAGGATTACTTCGGAC TTCA	GCTGGTGTGTGCT AATG
Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM1),	AAGAAGATAGCCAAC CAATGT	TACACGGTGAGGAA GGTT
Interleukin 6 (interferon, beta 2) (IL6)	CCAATCTGGATTCAAT GA	GTTCTCACTACTCT CAA
Jun oncogene (JUN)	ATGGAAACGACCTTCT ATG	TCTTGGGGTTACTG TAGC
Ligase I, DNA, ATP-dependent (LIG1)	GAAGTGGCAACAGAG AAG	CTTTGGAGGTCTTT AGGG
Ligase III, DNA, ATP-dependent (LIG3), nuclear gene encoding mitochondrial protein	GCTATATGTCTTTGGC TTTC	GGAATAGGCACAGT TCTT
Ligase IV, DNA, ATP-dependent (LIG4)	TGAGCACATTGAGAAG GA	CAGTAGGAGAAGC ACCAA
Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1)	GCTCCAAAGAAATCAA GACTGT	GGTGCCACTAACAC ATCTG

Anhang

Genprodukt	Sense Primer	Anti-sense Primer
Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3) (MMP13)	GGCTCTTAATGGTTAT GAC	GCACTTATCTTCTTAA CTTCT
Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase) (MMP3)	GAAGTACTAGCAAGG ACCTC	TCCAGCTCGTACCTCA TT
Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine) (MMP7)	TTGATAAGCACTGTTC CT	GCAAGTATAGATGAA TAAGACA
p53 binding protein homolog (MDM2)	ATCTTGATGCTGGTGT AA	AGGCTATAATCTTCTG AGTC
Meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae) (MRE11A)	GCCTGTCCAGTTTGAA AT	GGTTGCCATCTTGATA GTT
MutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli) (MSH2)	CTTCTTCTGGTTCGTCA GTATAGA	ATCATTCTCCTTGGAT GCCTTAT
NADPH oxidase 1 (NOX1), transcript variant NOH-1L	CTCTCCAGCCTATCTC AT	AATGTCACATACTCC ACTG
Nitric oxide synthase 2, inducible (NOS2)	AATCCAGATAAGTGAC ATAAG	CTCCACATTGTTGTTG AT
Nitric oxide synthase 3 (endothelial cell) (NOS3)	CAAGGAGACGAAGAG AAC	TGGAGTCTTGTGTAG GATA
N-methylpurine-DNA glycosylase (MPG),	CAACCGAGGCATGTTC AT	TGGAGATGTTTCATGC AGAAG
O-6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)	CTCTTCACCATCCCGTT T	AATCACTTCTCCGAAT TTCAC
Phosphatase and tensin homolog (PTEN)	ATCATCAAAGAGATCG TTA	ACCTTACTACATCATC AATA
Poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1)	GAACGACCTGATCTGG AA	CACTTGCTGCTTGTG AA
Polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit 125kDa (POLD1)	TCTGGGATGATGATGA TGC	GTGTTCTGCCTCCATC TC
Polymerase (DNA directed), epsilon (POLE)	TTTGGCATTGACATT GAG	AATCATCATAATCTG GTCTGT
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	TTACCATAGAGATGAA TGAACCA	AGTGTACCCTTGA GAG
RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae) (RAD51)	AATTAGTTCCAATGGG TTT	TGAAGTAGTTTGTCA AGC
Ras homolog gene family, member A (RHOA)	CCGATGTTATACTGAT GTG	ACAGAAATGCTTGAC TTC
Ras homolog gene family, member B (RHOB)	TGATCGTGTTTCAGTAA GGAC	CAATGTCCGCCACAT AGTT
Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1) (RAC1)	ATCAGTTACACAACCA AT	CGTAATCTGTCATAAT CTTC
REV1 homolog (S. cerevisiae) (REV1)	AACACATATTATTGCC ACAA	GAATGTAGGAGAGGA GTC
REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta (yeast) (REV3L)	AGTGTTCATTAGTATCA GGAA	TGTAGGAGGTAGGGA ATA
Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha (ARHGDI)	TCGTTTGTGCTGAAGG AG	TCATGCCGGACACTA TCT
Selectin E (SELE)	GCTATGACTTATGATG AG	ATCCAATCCAGTAAT AAC
Superoxide dismutase 1, soluble (SOD1)	TCTGTTTCAATGACCT GTATT	GCCTCATAATAAGTG CCATA
T-cell lymphoma invasion and metastasis 1 (TIAM1)	TAATGCTCTGAATCCT AGTC	GAAACAGAAGAGGCT TTG
Thioredoxin reductase 1 (TXNRD1)	CGAAATTATGGATGGA AAGTC	GAGCCAATGTGATTC TGTA

Anhang

Genprodukt	Sense Primer	Anti-sense Primer
Three prime repair exonuclease 1 (TREX1)	TCATGTGAAGAGG GAGAC	GAAGTTGGAGAGGGT GAG
TIMP metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP2)	AAGGAAGTGGACT CTGGAA	CTTTGAACATCTTTAT CTGCTTGA
Topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa (TOP2A)	ACGGTGTGGATAT TCTAAG	AAGCGAGCCTGATTAT TC
Topoisomerase (DNA) II beta 180kDa (TOP2B)	ATAACATTCCAACC AGAT	GGCAATTTCTTTCCAT TA
Tumor protein p53 (TP53)	AGCACTAAGCGAG CACTG	ACGGATCTGAAGGGT GAAA
Tumor protein p63 (TP63)	ATTGTTCTCCGTTT GTTGATA	GTAAGGGTCAGGGCA GTA
Tumor protein p73 (TP73)	CACTTTGAGGTCAC TTTC	ATCTGGCAGTAGAGTT TC
V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1 (AKT1)	ATTGTGAAGGAGG GTTGG	TGAAGGTGCCATCATT CT
Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1)	TGTCATTGAGGATA TTGGAA	ATAACTGTATTCTTGG GTGAT
WEE1 homolog (S. pombe) (WEE1)	TTCCAGAGATTAAG ACAA	ATATTCACTTGAGGAG TC
Werner helicase interacting protein 1 (WRNIP1)	CTGGAGACCAACG AAATC	TAATGTCACAAACCTT ATGC
Werner syndrome, RecQ helicase-like (WRN)	AAGATGTGCTGTAG AAGAA	TCGTAACTATACACAA TGGA
Xeroderma pigmentosum, complementation group A (XPA)	AAGGAAGTCCGAC AGGAA	ACACGCTGCTTCTTAC TG
Xeroderma pigmentosum, complementation group C (XPC)	ACACCTACTACCTC TCAA	TAAATAGCAAATCTCC TTTCC
X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1 (XRCC1)	GAGGAAGTTGGATT TGAA	ATTTAGGTCTCTTGGG AA
X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3 (XRCC3)	CATTGTTCTGTCTTT CCT	CTCCTTTACCGATTTT AG
X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 4 (XRCC4)	GTGTGAGTGCTAAG GAAG	CTCATCATAGACTGGA TCTC

7.2 Regulation der Genexpression durch Lovastatin und ionisierende Strahlung

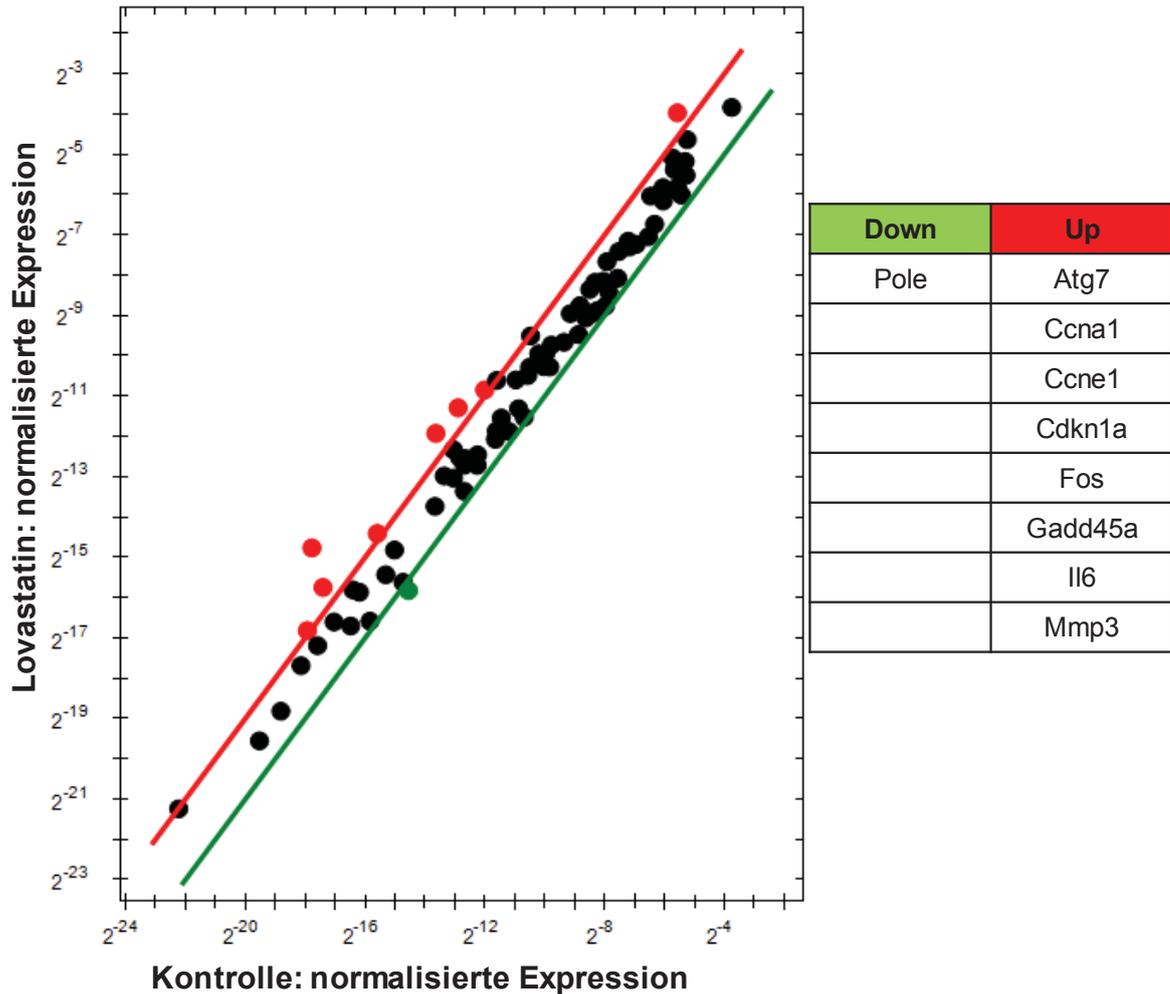


Abb. 49 Beeinflussung der Genexpression von HaCaT-Keratinocyten durch Lovastatin. Die HaCaT-Zellen wurden für 24 h mit 30 μ M Lovastatin inkubiert. 24 h nach dem Ende der Behandlung wurde, wie unter 3.7.1 beschrieben, die RNA-Isolation durchgeführt. Bei der Kontrolle handelte es sich um unbehandelte Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten normalisiert auf ACTB und GAPDH. Schwellenwert: 2,0.

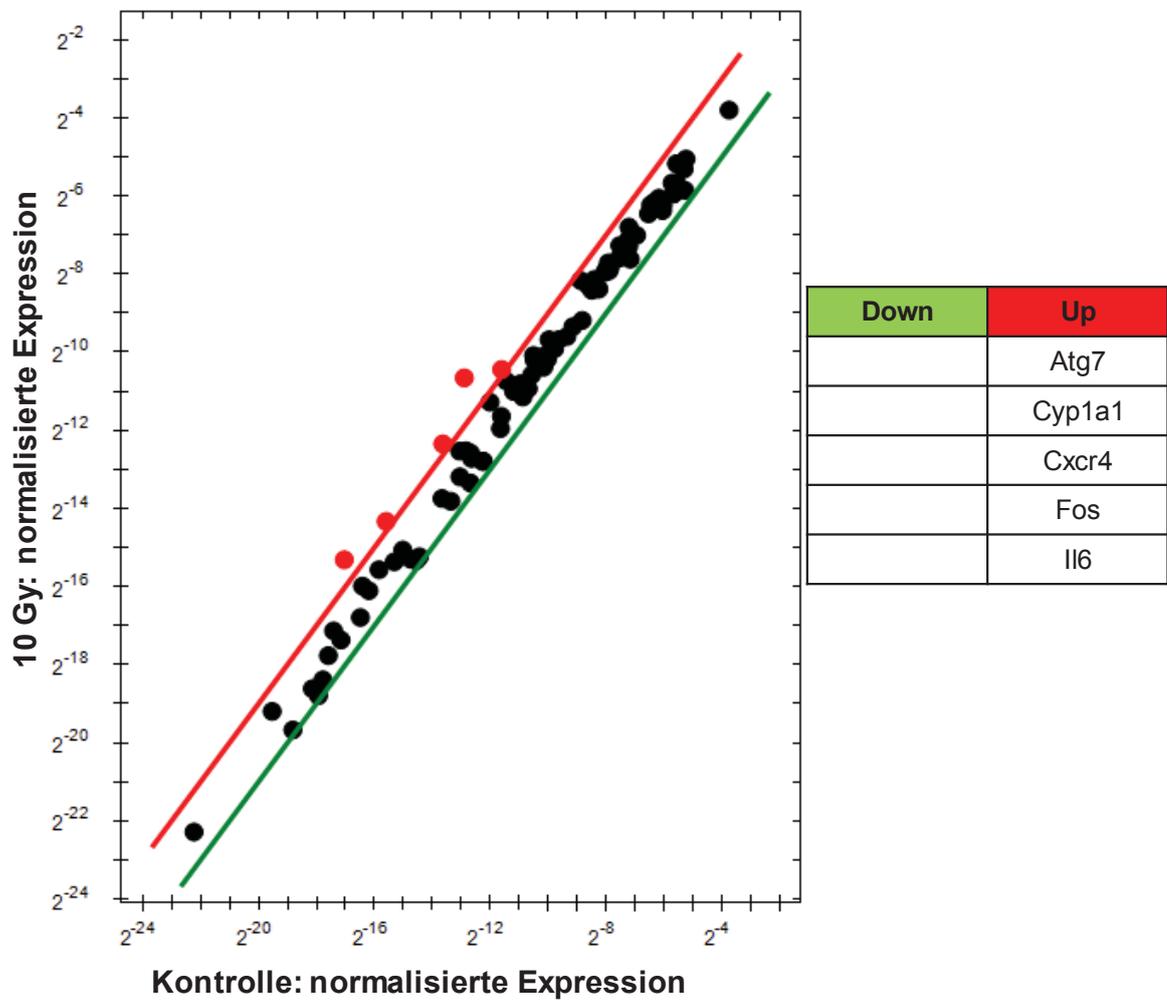


Abb. 50 Beeinflussung der Genexpression von HaCaT-Keratinocyten durch ionisierende Strahlung. Die HaCaT-Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen mit 10 Gy bestrahlt. 24 h nach der Bestrahlung wurde, wie unter 3.7.1 beschrieben, die RNA-Isolation durchgeführt. Bei der Kontrolle handelte es sich um nicht-bestrahlte Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten normalisiert auf ACTB und GAPDH. Schwellenwert: 2,0.

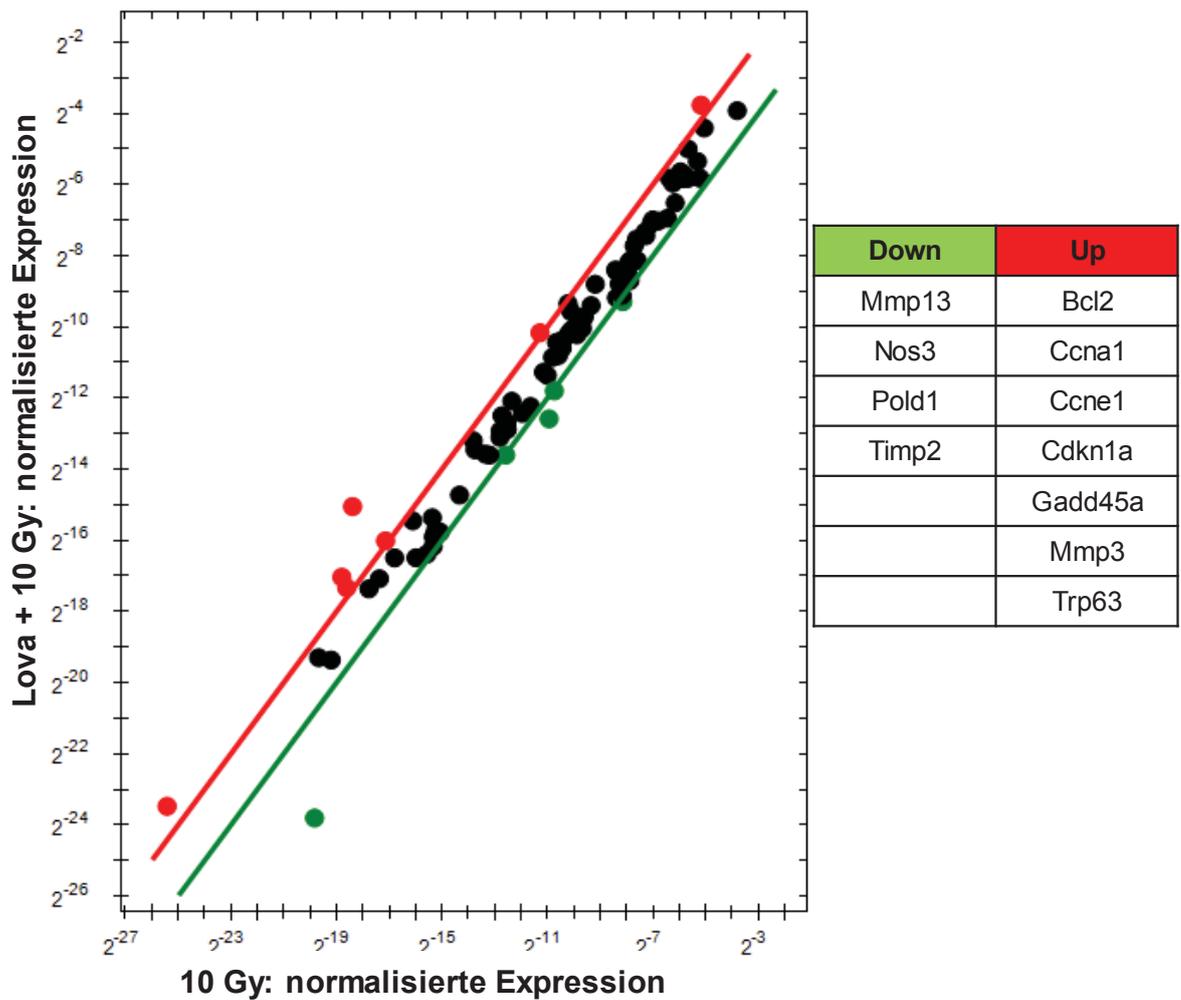


Abb. 51 Vergleichende Analyse der relativen normalisierten Genexpression bestrahlter HaCaT-Zellen nach einer Vorbehandlung mit Lovastatin. Nach einer 24-stündigen Vorbehandlung der HaCaT-Zellen mit 30 μ M Lovastatin erfolgte die Bestrahlung mit 10 Gy. 24 h später wurde, wie unter 3.7.1 beschrieben, die RNA-Isolation durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten normalisiert auf ACTB und GAPDH. Schwellenwert: 2,0.

8 Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. G. Fritz für die Überlassung des Themas, die stetige Unterstützung und die ausgezeichnete Zusammenarbeit bei der Durchführung des Projektes danken.

Im Weiteren gilt mein Dank Herrn Dr. C. Henninger für die Unterstützung bei der praktischen Durchführung, für die Anregungen und zielführenden Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Frau V. Ziegler, M. Sc., für die Einarbeitung in die Zellkultur, die Hilfestellungen, die Sonntagabende im Labor und die unermüdliche Supervision dieser Arbeit.

Danken möchte ich dem gesamten Team des Instituts für Toxikologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf für das freundschaftlich-kollegiale Verhältnis und die zahlreichen Hilfestellungen bei der praktischen Durchführung.

Zuletzt gilt der Dank meinen Eltern für die persönliche und unbedingte Unterstützung.

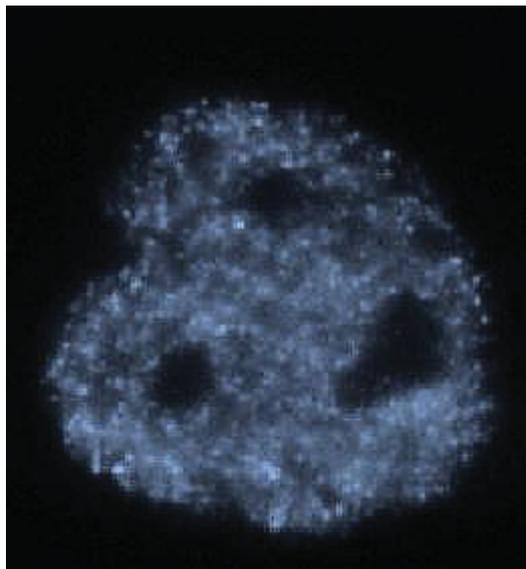


Abb. 52 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der DAPI-Kernfärbung eines HaCaT-Keratinocyten.